

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET EN BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
CINDY TREMBLAY**

**IMPLICATION DE NUR77 DANS LA NEUROPROTECTION EXERCÉE PAR
L'ACIDE DOCOSAHEXAÉNOÏQUE, LE RESVÉRATROL ET
LE β -ESTRADIOL**

AVRIL 2009

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite adresser tous mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de mon mémoire.

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, le professeur Maria-Grazia Martinoli, qui m'a acceptée dans son laboratoire dès mon stage au baccalauréat et qui m'a donné l'opportunité d'effectuer une maîtrise. Grâce à ses encouragements, ses conseils et son aide, j'ai découvert une passion et une carrière. Je suis extrêmement reconnaissante de la confiance que vous m'avez témoignée.

Je remercie Claude Rouillard, Daniel Lévesque et Keith Chiasson pour l'élaboration du projet et le prêt de matériel. Pour l'aide technique, pour les conversations productives et pour votre amitié, un gros merci à Julie Bournival, Vicky et Fanny. Je remercie aussi mes collègues de laboratoire Marilyn et Julie Carange pour leur soutien, ainsi que Manon pour ses judicieux conseils.

Merci à mes parents et mes amis pour leurs encouragements inépuisables et leur confiance. Je remercie surtout mon amoureux qui m'a appuyé dans cette grande aventure, qui m'a donné le courage et la force pour continuer. Merci d'être aussi compréhensif et fier de moi. Je t'adore.

Merci.

RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques dans la substance noire du cerveau. Cette perte neuronale résulte en une diminution de dopamine dans le striatum, ce qui génère les symptômes moteurs liés à la maladie. Nur77, un récepteur nucléaire orphelin, est impliqué dans les mécanismes cellulaires de la transmission dopaminergique et joue un rôle important dans les effets biochimiques de drogues anti-parkinsoniennes et neuroleptiques. De plus, sa translocation du noyau au cytoplasme entraîne l'apoptose de cellules cancéreuses sous l'action d'agents chimiothérapeutiques. La liaison de Nur77 à son partenaire d'hétérodimérisation, le récepteur rétinoïde X (RXR), est nécessaire pour accomplir cet effet et la liaison de ligands au RXR pourrait abolir la translocation de l'hétérodimère. Puisque cette translocation n'a pas encore été mise en évidence dans les cellules neuronales, nous avons voulu vérifié son implication dans le processus de mort apoptotique induite par deux neurotoxines oxydantes. Le but spécifique de ce projet est de déterminer comment un acide gras omega-3 qui est aussi un ligand du RXR, l'acide docosahexaénoïque (DHA), un phytoestrogène, le resveratrol, et l'estradiol peuvent contrecarrer la mort apoptotique des cellules PC12. Dans le cas du DHA, la mort cellulaire a été induite par deux neurotoxines, la 6-OHDA et le MPP⁺ (métabolite actif du MPTP), alors que les expérimentations avec l'estradiol et le resvératrol ont été effectuées avec la 6-OHDA seulement. Nos résultats démontrent que le MPP⁺ et la 6-OHDA induisent la translocation de Nur77 du noyau vers le cytoplasme et celle-ci est diminuée par l'administration de DHA. L'estradiol, contrairement au resveratrol, diminue la quantité de Nur77 transloquée du noyau au cytoplasme suite au traitement à la 6-OHDA. Ces résultats sont les premiers à mettre en évidence la translocation de Nur77 dans le processus de mort apoptotique induite par des neurotoxines parkinsoniennes et ouvrent la voie vers la compréhension du mécanisme d'action de ce récepteur nucléaire intrigant.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	XI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 La maladie de Parkinson.....	1
1.1.1 Un bref historique	1
1.1.2 Les données épidémiologiques	1
1.2 Les symptômes cliniques de la MP.....	2
1.2.1 Les symptômes moteurs.....	2
1.2.2 Les symptômes non-moteurs	4
1.3 La MP d'un point de vue neuropathologique	4
1.4 Les caractéristiques neuropathologiques	7
1.4.1 La perte de pigmentation dans la SNpc.....	7
1.4.2 La présence des corps de Lewy	7
1.4.3 Les atteintes non-dopaminergiques	9
1.5 La pathogenèse de la MP	9
1.5.1 Le stress oxydant.....	9
1.5.1.1 Les sources du stress oxydant dans la MP	10
1.5.1.2 Les cibles du stress oxydant dans la MP	15
1.5.2 Le stress protéotoxique	16
1.5.2.1 L'agrégation protéique	17
1.5.2.2 La dysfonction du système ubiquitine-protéasome	18

1.5.3	Le rôle de l'inflammation.....	18
1.5.4	Les cas héréditaires de la MP	19
1.5.4.1	Le gène de l' α -SYN	20
1.5.4.2	Le gène de la Parkin	20
1.5.4.3	Le gène DJ-1	21
1.5.4.4	Le gène PINK1	21
1.5.4.5	Le gène LRRK2	21
1.6	Les modèles pharmacologiques pour l'étude de la MP	22
1.6.1	Le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine et son métabolite actif	22
1.6.1.1	L'internalisation et la conversion du MPTP	23
1.6.1.2	Le mode d'action du MPP+	23
1.6.2	La 6-hydroxydopamine	24
1.6.2.1	L'internalisation de la 6-OHDA	24
1.6.2.2	Le mode d'action de la 6-OHDA	25
1.6.3	Les autres modèles pharmacologiques pour l'étude de la MP	25
1.7	Les traitements actuels de la MP	26
1.7.1	Le traitement pharmacologique	26
1.7.2	La neurochirurgie.....	27
1.7.3	La thérapie préventive	27
1.8	Les facteurs de transcription et la transmission dopaminergique.....	28
1.8.1	Le facteur de transcription Nur77	28
1.8.1.1	La structure de Nur77	29
1.8.1.2	Nur77 et sa liaison à l'ADN	30
1.8.1.3	Nur77 l'agent inducteur d'apoptose et de survie cellulaire.	30
1.8.1.4	Les modifications post-transcriptionnelles de Nur77	33
1.8.1.5	Le rôle de Nur77 dans le système dopaminergique	34
1.8.2	Le RXR	35

1.8.2.1	Les partenaires d'hétérodimérisation du RXR	36
1.8.2.2	La liaison des ligands à l'hétérodimère RXR/Nur77	36
1.9	Les molécules d'intérêt dans ce mémoire	36
1.9.1	L'acide docosahexaénoïque	37
1.9.1.1	Généralités	37
1.9.1.2	L'incorporation de DHA dans le cerveau.....	38
1.9.1.3	La neuroprotection par le DHA.....	39
1.9.1.4	Le mécanisme d'action du DHA.....	40
1.9.2	L'estradiol	41
1.9.2.1	Généralités	41
1.9.2.2	La neuroprotection par l'E2.....	42
1.9.2.3	Le mécanisme d'action de l'E2.....	43
1.9.2.4	Les effets secondaires de la thérapie estrogénique	45
1.9.3	Le resvératrol	46
1.9.3.1	Généralités	46
1.9.3.2	La neuroprotection par le Resv	46
1.9.3.3	Le mécanisme d'action du Resv	47
1.10	Les objectifs du mémoire.....	49
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES		51
2.1	Culture des cellules PC12.....	51
2.2	Potentiel protecteur du DHA envers la toxicité du MPP+ et de la 6-OHDA	52
2.3	Effet du traitement au MPP+ ou à la 6-OHDA et du pré-traitement au DHA sur la localisation cellulaire de Nur77	54
2.4	Potentiel protecteur de l'E2 et du Resv envers la toxicité de la 6-OHDA	57
2.5	Effet du traitement au 6-OHDA et du pré-traitement à l'E2 et au Resv sur la localisation cellulaire de Nur77.....	58

2.6	Vérification de l'interaction entre le DHA, l'E2 et le Resv avec l'hétérodimère RXR/Nur77	58
2.7	Analyses statistiques des données	60
CHAPITRE 3 RÉSULTATS		61
3.1	Potentiel protecteur du DHA sur la toxicité induite par le MPP+ et la 6-OHDA	61
3.2	Modulation de l'expression de Nur77 dans le cytoplasme et le noyau suite au traitement au MPP+ et à la 6-OHDA	62
3.3	Modulation de l'expression de Nur77 dans le cytoplasme et le noyau suite à un pré-traitement au DHA.....	65
3.4	Potentiel protecteur de l'E2 et du Resv sur la toxicité induite par la 6-OHDA	68
3.5	Modulation de l'expression de Nur77 dans le cytoplasme et le noyau suite à un pré-traitement à l'E2 et au Resv et un traitement à la 6-OHDA.....	70
3.6	Vérification de l'interaction entre le DHA, l'E2 et le Resv avec l'hétérodimère Nur77/RXR	73
CHAPITRE 4 CONCLUSIONS		76
4.1	Principales conclusions apportées par les résultats obtenus	76
4.2	Perspectives de recherche	79
BIBLIOGRAPHIE		81

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.01 :	Représentation de la posture d'un malade parkinsonien	3
FIGURE 1.02 :	Marquage de la DA dans un cerveau normal et parkinsonien.	5
FIGURE 1.03 :	Schéma de la voie nigro-striée responsable du mouvement volontaire.....	5
FIGURE 1.04 :	Schéma des voies motrices atteintes dans la MP.....	6
FIGURE 1.05 :	Perte de pigmentation dans la SNpc.....	7
FIGURE 1.06 :	Observation des CLs par microscopie.	8
FIGURE 1.07 :	Représentation des voies de survie et de mort cellulaire impliquant le stress oxydant.....	10
FIGURE 1.08 :	Formation de ROS et RNS par la mitochondrie.	11
FIGURE 1.09 :	Réactions d'oxydation de la dopamine (1, 2 et 3), réaction catalysée par la GSH (4) et réaction de Fenton (5).....	12
FIGURE 1.10 :	Hypothèses sur l'implication du fer et du stress oxydant dans la MP.....	13
FIGURE 1.11 :	Mécanismes de détoxification cellulaire par les enzymes antioxydantes.....	14
FIGURE 1.12 :	Oxydation de la dopamine et formation de la 5-S-cystéinyl- DA.....	16
FIGURE 1.13 :	Effet toxique des quinones de la DA dans la cellule.....	17
FIGURE 1.14 :	Schéma du rôle de l'inflammation dans la pathogenèse de la MP.....	19
FIGURE 1.15 :	Schéma des mutations géniques causant la MP.....	19
FIGURE 1.16 :	Structures chimiques du MPTP, du MPPP et du MPP+.....	22
FIGURE 1.17 :	Internalisation (a) et mode d'action (b) du MPTP.....	23
FIGURE 1.18 :	Mécanisme d'action neurotoxique de la 6-OHDA.....	25
FIGURE 1.19 :	Résumé des stimuli qui induisent l'expression des membres du groupe NR4A.	29
FIGURE 1.20 :	Représentation de la structure d'un récepteur nucléaire.....	29
FIGURE 1.21 :	Différents modes de liaison de Nur77 (a) et les éléments de réponses (b).....	30
FIGURE 1.22 :	Schéma du double rôle de Nur77 dans les cellules cancéreuses.....	31

FIGURE 1.23 :	Effet de modifications de la transmission dopaminergique sur l'expression de Nur77.	35
FIGURE 1.24 :	Schéma de la conversion de LNA en DHA.	37
FIGURE 1.25 :	Schéma de la structure et des actions de l'E2 dans le SNC. ...	42
FIGURE 1.26 :	Courbe de l'incidence de la MP chez les hommes et les femmes.	43
FIGURE 1.27 :	Schéma du mode d'action classique et non-classique de l'E2.	44
FIGURE 1.28 :	Structure chimique du Resv.	46
FIGURE 1.29 :	Schéma de l'effet antioxydant du Resv.	48
FIGURE 1.30 :	Schéma de l'initiation de l'apoptose par le Resv dans des cellules cancéreuses.	49
FIGURE 2.01 :	Représentation des cellules PC12. À gauche, les PC12 naïves et à droite, les PC12 différenciées.	51
FIGURE 2.02 :	Schéma de la cinétique des traitements.	52
FIGURE 2.03 :	Schéma des réactions enzymatiques impliquées dans le test de cytotoxicité LDH.	53
FIGURE 2.04 :	Structure chimique du HX531.	60
FIGURE 3.01 :	Mesure de la mortalité cellulaire par la technique LDH suite au pré-traitement au DHA et au traitement au MPP+.	61
FIGURE 3.02 :	Mesure de la mortalité cellulaire par la technique LDH suite au pré-traitement au DHA et au traitement à la 6-OHDA. ...	62
FIGURE 3.03 :	Évaluation de la localisation de Nur77 par immunofluorescence suite au traitement de 9 heures au MPP+ et à la 6-OHDA.	63
FIGURE 3.04 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement au MPP+.	64
FIGURE 3.05 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement à la 6-OHDA.	65
FIGURE 3.06 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement au DHA.	66
FIGURE 3.07 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au pré-traitement au DHA et au traitement au MPP+.	66
FIGURE 3.08 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au pré-traitement au DHA et au traitement à la 6-OHDA.	67

FIGURE 3.09 :	Vérification de la séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires.....	68
FIGURE 3.10 :	Mesure de la mortalité cellulaire par la technique LDH suite au pré-traitement à l'E2 et au Resv et au traitement à la 6-OHDA.....	69
FIGURE 3.11 :	Mesure de l'apoptose par la quantification de l'ADNss suite au pré-traitement à l'E2 ou au Resv et au traitement à la 6-OHDA.....	69
FIGURE 3.12 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement à l'E2.....	70
FIGURE 3.13 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement au Resv.	71
FIGURE 3.14 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement à la 6-OHDA.	72
FIGURE 3.15 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au pré-traitement à l'E2 et au traitement à la 6-OHDA.....	72
FIGURE 3.16 :	Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au pré-traitement au Resv et au traitement à la 6-OHDA.....	73
FIGURE 3.17 :	Immunobuvardage avec l'anticorps anti-RXR des complexes nucléaires immunoprécipités avec l'anticorps anti-Nur77 en conditions dénaturantes.	74
FIGURE 3.18 :	Mesure de la cytotoxicité par la technique LDH lors de l'ajout d'un antagoniste du RXR, le HX531, en même temps que le DHA.	75

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
A β	Amyloïde β
ABTS	2,2'-azino-bis (3-éthylbenziazoline-6-sulfonic acid)
AF	Fonction activatrice
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Cat	Catalase
CL	Corps de Lewy
COMT	Inhibiteur de la cathécolamine-O-méthyl-transférase
DA	Dopamine
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindole
DAT	Transporteur de la dopamine
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DBS	Stimulation cérébrale profonde
DHA	Acide docosahexaénoïque
DOPAC	Acide dihydroxyphénylacétique
DYN	Dynorphine
E2	17 β -estradiol
ENK	Enképhaline
ER	Récepteur estrogénique
ERK	Kinases régulées par des signaux extracellulaires
ERR	Récepteur associé au récepteur estrogénique
GFP	Protéine fluorescente verte
GPX	Gluthatione peroxydase
GSH	Gluthatione
HDAC1	Histone déacétylase 1
HNE	4-hydroxynonéanal
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
IEG	Gène à induction rapide

LBD	Domaine de liaison du ligand
LDH	Lactate déshydrogénase
L-dopa	Lévodopa
LNA	Acide α -linoléïque
LPNG	Lait en poudre non-gras
MA	Maladie d'Alzheimer
MAO	Monoamine oxydase
MP	Maladie de Parkinson
MPDP+	1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium
MPP+	1-méthyl-4-phényl pyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MTP	Transition de perméabilité mitochondriale
NES	Signal d'export nucléaire
NET	Transporteur noradrénergique
NGF	Facteur de croissance neuronal
NM	Neuromélanine
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
O ₂	Oxygène
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH [•]	Radical hydroxyl
6-OHDA	6-hydroxydopamine
ONOO-	Peroxynitrite
PBS	Tampon phosphate salin
PUFA	Acide gras polyinsaturé
PVDF	Polyvinilidène difluoré
9-cis-RA	Acide 9-cis-rétinoïque
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
Resv	Resvératrol
RNS	Espèces azotées réactives
ROS	Espèces oxygénées réactives

RXR	Récepteur rétinoïde X
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SET	Transporteur sérotoninergique
SNC	Système nerveux central
SNpc	Partie compacte de la substance noire
SOD	Superoxyde dismutase
α -SYN	α -synucléïne
TH	Tyrosine hydroxylase
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
UPS	Système ubiquitine-protéasome
VMAT	Transporteur monoamine vésiculaire

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La maladie de Parkinson

1.1.1 Un bref historique

C'est en 1817 que James Parkinson publia son célèbre essai intitulé «An Essay on the Shaking Palsy» qui décrivait une maladie paralysante et agitante qui porte maintenant son nom. Par l'étude de 6 cas, le médecin a caractérisé la maladie de Parkinson (MP) comme étant une maladie progressive débutant par des tremblements des membres au repos et une lenteur dans l'exécution des mouvements volontaires dont le diagnostic est difficile à déterminer (Parkinson, 2002). Après plusieurs années de recherche sur le rôle de la dopamine (DA), Hornykiewicz a analysé six cerveaux *post-mortem* de parkinsoniens et démontré qu'une baisse en DA dans le noyau caudé et le putamen était associée à la MP. Peu après, le chercheur proposa qu'une perte des neurones dans la partie compacte de la substance noire (SNpc) du cerveau était responsable de ce déficit en DA (Hornykiewicz, 2006). Cette découverte ouvra la porte à plusieurs études sur les causes et les traitements de la maladie.

1.1.2 Les données épidémiologiques

L'âge moyen lors du diagnostic de la MP est de 55 ans et seulement 10 % des personnes atteintes ont 45 ans ou moins (Weintraub et al., 2008a). L'incidence de la MP est difficile à déterminer puisque le diagnostic demeure un défi. La MP atteint entre 1 et 2 % de la population âgée de plus de 65 ans et la prévalence augmente entre 3 et 5 % pour la population de 85 ans et plus (Alves et al., 2008). Puisque la proportion de population de cette tranche d'âge augmente très rapidement, la prévalence de la MP risque d'augmenter dramatiquement au

cours des prochaines années (Toulouse and Sullivan, 2008). De plus, certains facteurs de risques sont associés au développement de la MP. Par exemple, l'incidence de la maladie varie selon des facteurs tels que l'ethnie, la géographie et le sexe, mais l'âge demeure le facteur de risque le plus important (Van Den Eeden et al., 2003; Vanitallie, 2008). L'exposition prolongée à des toxines environnementales aurait un impact réel sur le développement de la MP et des mutations géniques sont associés aux rares cas de MP héréditaire à début précoce (Elbaz and Tranchant, 2007). En général, la MP est considérée comme une maladie multifactorielle résultant de la combinaison d'une susceptibilité génétique et de l'exposition à des facteurs environnementaux.

1.2 Les symptômes cliniques de la MP

Les symptômes cliniques apparaissent lorsqu'il y a une perte de plus de 50 % des neurones dopaminergiques dans la SNpc et de 80 % de DA dans le striatum (Dauer and Przedborski, 2003). L'âge du déclenchement de la maladie, la progression et le profil des symptômes diffèrent selon le patient (Weintraub et al., 2008a). La diminution en DA dans la voie nigro-striée provoque les quatre manifestations motrices cardinales chez les malades parkinsoniens et une variété de symptômes non-moteurs décrits ci-dessous.

1.2.1 Les symptômes moteurs

De façon générale, les manifestations motrices commencent asymétriquement et se propagent vers le côté controlatéral. Le symptôme initialement associé à la MP consiste en des **tremblements des membres au repos** qui diminuent lors de l'exécution des mouvements volontaires. Ils n'entravent pas les activités du malade parkinsonien et impliquent souvent les membres distaux tels que le pouce et le poignet. La **bradykinésie** (lenteur d'exécution des mouvements) est le symptôme le plus encombrant puisqu'il implique que les malades doivent consacrer plus de temps pour des tâches quotidiennes. L'akinésie est la

manifestation extrême de la bradykinésie et consiste en l'incapacité à initier un mouvement. L'akinésie est caractéristique du parkinsonien qui n'a plus le réflexe de bouger les bras lors de la marche. La **rigidité** ou **hypertonie** est la résistance des membres à un mouvement passif et est surtout retrouvée dans les membres distaux. Le groupe musculaire étiré a tendance à conserver sa position au lieu de se relâcher. La rigidité est responsable de la posture typique du patient parkinsonien qui a le dos voûté et le buste penché vers l'avant (Figure 1.01).



FIGURE 1.01 : Représentation de la posture d'un malade parkinsonien. (Nutt et al., 1992)

La rigidité provoque une raideur cédant par coups qui entraîne un mouvement saccadé, nommé phénomène de la roue dentée. L'**instabilité posturale** caractérise un état plus avancé de la maladie. Cette caractéristique est souvent résistante au traitement. Cette manifestation est dangereuse puisque le malade risque de se blesser suite à des chutes, ce qui le confine souvent en chaise roulante (Dauer and Przedborski, 2003; Pollak, 2000; Weintraub et al., 2008a; Zagnoli and Rouhart, 2006).

Le diagnostic positif de la MP est posé lorsque deux des quatre manifestations sont rencontrées. De plus, le patient doit avoir une bonne réponse au traitement pharmacologique symptomatique. Le diagnostic définitif requiert par contre une

confirmation *post-mortem* de la présence des caractéristiques pathologiques (Alves et al., 2008).

1.2.2 Les symptômes non-moteurs

Les troubles non-moteurs associés à la MP sont une source de complications pour les malades. Les symptômes les plus connus sont l'anxiété, la dépression, la fatigue, les troubles sensitifs et les troubles du sommeil. Alors que les symptômes moteurs sont renversés par le traitement symptomatique de la maladie, les symptômes non-moteurs continuent de diminuer la qualité de vie des malades. Un sondage mené chez 99 patients parkinsoniens a montré que 88 % de ce nombre avait au moins une manifestation non-motrice, et 11 % en possédait cinq (Shulman et al., 2001). Au cours des dernières années, l'emphasis a été portée sur la démence associée à la MP puisque son incidence est de 95,3 sur 1000 personnes atteintes (Merims and Freedman, 2008).

1.3 La MP d'un point de vue neuropathologique

Afin de mieux comprendre la MP, il est important de détailler les mécanismes qui provoquent les symptômes moteurs. Le comportement moteur d'un individu normal est modulé de façon importante par les différents systèmes dopaminergiques. Les neurones dopaminergiques sont distribués dans la SNpc et l'aire tegmentale ventrale. Dans la MP, il y a une atteinte sévère des neurones dopaminergiques de la SNpc (système nigro-strié) par rapport à ceux de l'aire tegmentale ventrale (systèmes mésolimbique et mésocortical). Ainsi, la diminution en DA est plus marquée dans le putamen que dans le noyau caudé (Figure 1.02) (Thobois et al., 2001). La MP atteint principalement la voie nigro-striée impliquée dans le contrôle des mouvements volontaires. Celle-ci est représentée à la figure 1.03.

[¹⁸F]DOPA

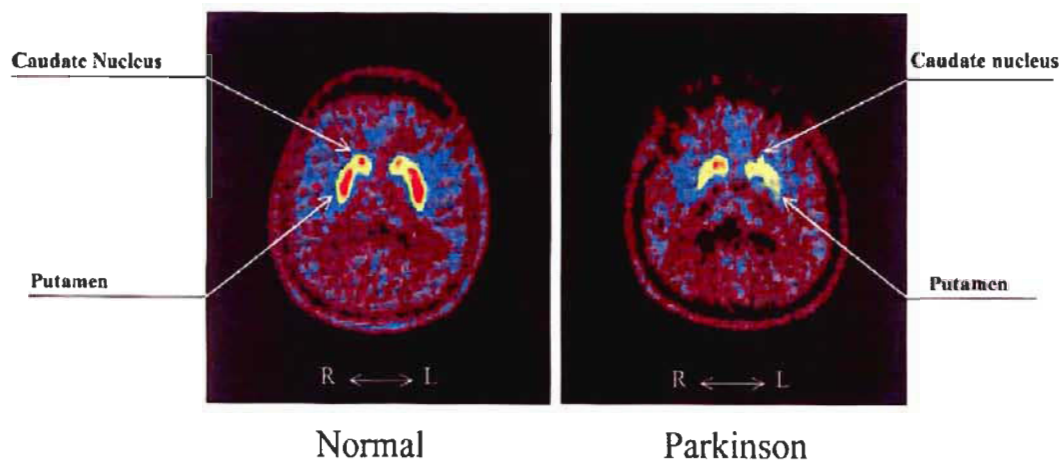


FIGURE 1.02 : Marquage de la DA dans un cerveau normal et parkinsonien. (Thobois et al., 2001)

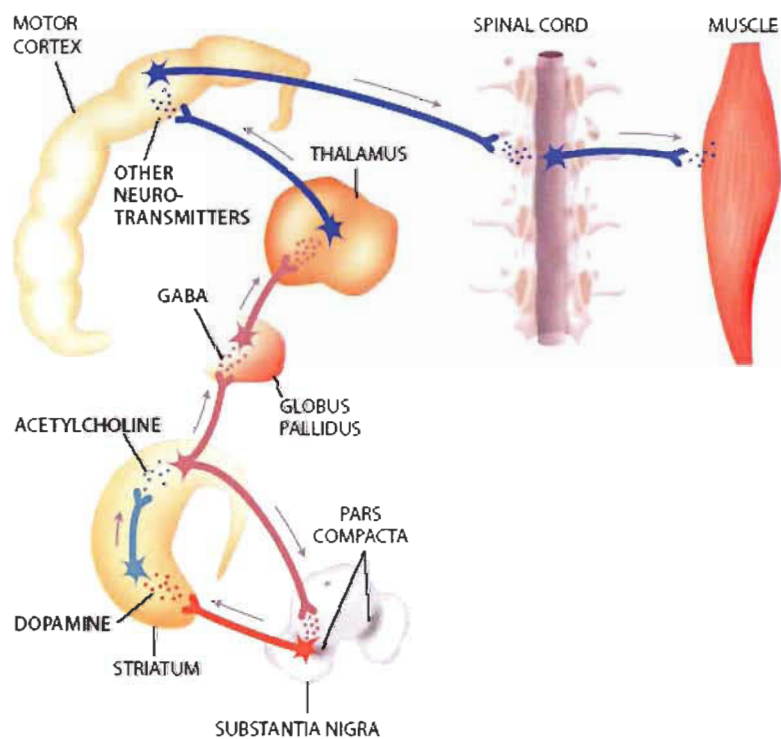


FIGURE 1.03 : Schéma de la voie nigro-striée responsable du mouvement volontaire. (Youdim and Riederer, 1997)

Les afférences que le striatum reçoit proviennent du cortex, du thalamus et de la SNpc. Celles-ci ont pour effet normal une excitation des neurones qui projettent sur le pallidum interne via les **récepteurs dopaminergiques D1 dans la voie directe** et une inhibition des neurones qui projettent sur le pallidum externe via les **récepteurs dopaminergiques D2 dans la voie indirecte** (Figure 1.04) (Galvan and Wichmann, 2008).

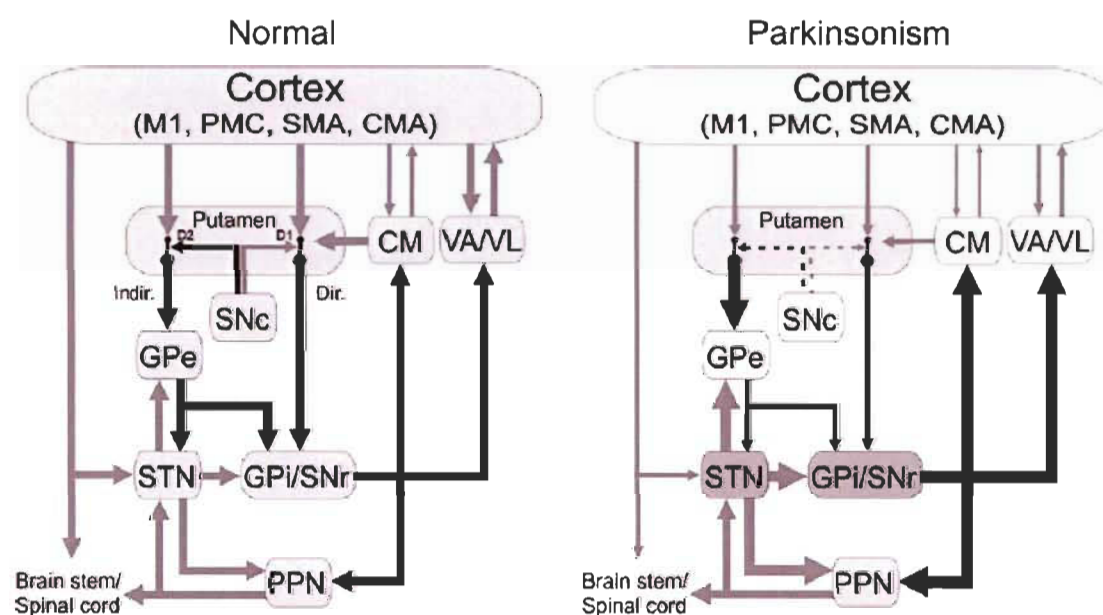


FIGURE 1.04 : Schéma des voies motrices atteintes dans la MP. (Galvan and Wichmann, 2008)

Lorsque l'influx nerveux traverse le neurone vers la terminaison nerveuse, la DA est libérée des vésicules vers la fente synaptique. À ce niveau, la DA peut agir sur les récepteurs pré- et post-synaptiques. L'action nette de la dopamine libérée dans le striatum est de réduire l'activité du pallidum interne et de cette façon faciliter l'activité du thalamus vers le cortex responsable du mouvement (Galvan and Wichmann, 2008). Lors de l'atteinte des neurones dopaminergiques de la SNpc dans la MP, les efférences inhibitrices sont anormalement élevées, ce qui rend l'activation thalamique des neurones moteurs corticaux moins probable. Les symptômes moteurs observés reflètent donc d'une défaillance de la désinhibition des ganglions de la base.

1.4 Les caractéristiques neuropathologiques

1.4.1 La perte de pigmentation dans la SNpc

La neuromélanine (NM) est le marqueur des neurones dopaminergiques de la SNpc, et la dépigmentation de la SNpc est marquée dans les cerveaux de patients avec la MP (Figure 1.05).



FIGURE 1.05 : Perte de pigmentation dans la SNpc. À gauche, un cerveau sain et à droite, un cerveau parkinsonien. (Youdim and Riederer, 1997)

La NM permet la séparation de la SNpc en quatre segments : le noyau paranigral et les parties ventrales, médiales et dorsales. La NM est localisée dans des lysosomes, nommés mélanosomes, dans lesquels elle y serait synthétisée à partir de la DA. La NM aurait un effet protecteur puisqu'elle prévient les effets toxiques d'une trop grande quantité de DA cytosolique en plus de générer des complexes stables avec des métaux toxiques et d'empêcher leur action (Zecca et al., 2008). La partie ventrolatérale de la SNpc est plus sévèrement affectée et les cellules de cette division contiennent peu de NM dans leur cytoplasme par rapport aux divisions médiale, dorsale et au noyau paranigral (Wakabayashi et al., 2006).

1.4.2 La présence des corps de Lewy

Les corps de Lewy (CLs) sont des inclusions éosinophiliques distribuées dans le corps cellulaire et les prolongements des cellules du système nerveux central

(SNC) des parkinsoniens. Les CLs sont composés d'un halo de fibrilles radiales et d'un centre moins défini (Figure 1.06).

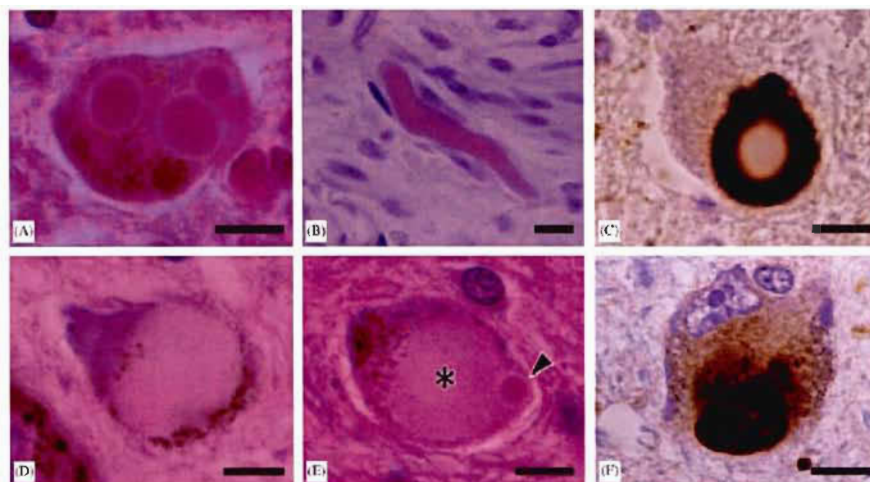


FIGURE 1.06 : Observation des CLs par microscopie. (Wakabayashi et al., 2006)

Ce marqueur n'est pas exclusif à la MP puisqu'il est retrouvé dans d'autres maladies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA) et la démence avec CLs (Uversky, 2007). Des inclusions distinctes nommées corps pâles sont aussi retrouvées dans les cellules pigmentées et sont juxtaposées ou voisines des CLs (Figure 1.06 D et E). Celles-ci pourraient être les précurseurs des CLs puisqu'elles sont présentes en grande quantité dans les stages précoces de la MP (Wakabayashi et al., 2006). Le CL est principalement composé de filaments d' α -synucléine (α -SYN) de 200 à 600 nm de longueur et d'un diamètre entre 5 et 10 nm. D'autres protéines, incluant l'ubiquitine, le protéasome, des protéines de choc thermique et des neurofilaments, y sont présentes. À son état naïf, l' α -SYN est une molécule non-repliée, soluble et concentrée dans les terminaisons pré-synaptiques. Dans le neurone, l' α -SYN est associée avec les compartiments membranaires par une interaction avec les têtes acides des phospholipides et elle pourrait jouer un rôle dans le trafic des vésicules synaptiques (Robinson, 2008). Sa région centrale hydrophobique favorise une structure en doigt, la protofibrille, qui forme ultimement des polymères insolubles, soit les fibrilles amyloïdes qui constituent les CLs. Des mutations dans le gène ou des modifications post-traductionnelles par la nitration ou la

phosphorylation des résidus tyrosines favorisent son agrégation (Danielson and Andersen, 2008). Les études sur l'effet neurotoxique des agrégats d' α -SYN sont mitigées. Pour la plupart, la surexpression de la protéine ou une mutation dans son gène entraîne la perte sélective des neurones dopaminergiques (Dawson and Dawson, 2003; Gandhi and Wood, 2005; Lotharius and Brundin, 2002; Wakabayashi et al., 2006).

1.4.3 Les atteintes non-dopaminergiques

Les répercussions de la MP ne se limitent pas aux neurones dopaminergiques de la voie nigro-striée. En effet, les neurones pigmentés du locus coeruleus, la principale source d'innervation noradrénergique du SNC, sont diminués entre 50 et 80 %. Une perte neuronale est aussi retrouvée dans le noyau raphé dorsal sérotoninergique et dans le système cholinergique. La perte neuronale dans l'hippocampe et les noyaux cholinergiques pourrait expliquer les cas de démence dans la MP (Wakabayashi et al., 2006).

1.5 La pathogenèse de la MP

La mort neuronale est un processus naturel dans le vieillissement et une personne adulte normale perd environ 4 % du nombre total de neurones dopaminergiques à chaque décennie (Youdim and Riederer, 1997; Zagnoli and Rouhart, 2006). Alors que les symptômes et les caractéristiques de la MP sont connus depuis l'antiquité, les causes qui favorisent la dégénérescence dopaminergique dans la MP demeurent incertaines. Les hypothèses les plus reconnues seront présentées dans cette partie du mémoire.

1.5.1 Le stress oxydant

Plusieurs réactions cellulaires utilisent l'oxygène (O_2) pour catalyser et produire de l'énergie. En retour, ces réactions produisent des espèces oxygénées

réactives (ROS) et des espèces azotées réactives (RNS). Le stress oxydant est une condition résultant d'un déséquilibre des défenses antioxydantes cellulaires qui ne peuvent plus contrecarrer la production excessive de ROS et de RNS, ce qui conduit à la mort cellulaire (Figure 1.07) (Lotharius and Brundin, 2002). Le cerveau est particulièrement vulnérable au stress oxydant puisqu'il consomme 20 % de l' O_2 du corps. L'implication du stress oxydant dans la MP est supportée par des études *post-mortem* et épidémiologiques qui montrent que des anomalies génétiques ou l'exposition à des toxines environnementales induisent la dégénérescence neuronale par un mécanisme impliquant le stress oxydant (Fukae et al., 2007; Jenner, 2003).

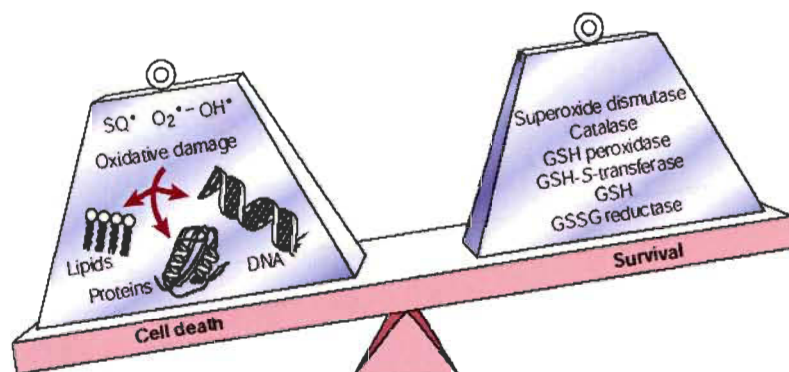


FIGURE 1.07 : Représentation des voies de survie et de mort cellulaire impliquant le stress oxydant. (Lotharius and Brundin, 2002)

1.5.1.1 Les sources du stress oxydant dans la MP

La dysfonction mitochondriale et la génération de ROS

La phosphorylation oxydative mitochondriale est la principale source de composés à forte énergie dans la cellule. Puisque 95 % de l' O_2 est capté par la mitochondrie, celle-ci est une source majeure de production de radicaux libres et de composés non-radicalaires qui formeront des radicaux libres. L'addition d'un électron à l' O_2 produit l'anion superoxyde (O_2^{*-}), qui peut être converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD). L'oxyde nitrique synthase (NOS), sous l'effet d'une augmentation de calcium, peut aussi

former de l'oxyde nitrique (NO) qui, en présence d' $O_2^{\bullet-}$, forme du peroxynitrite ($ONOO^-$) (Figure 1.08) (Chinta and Andersen, 2008).

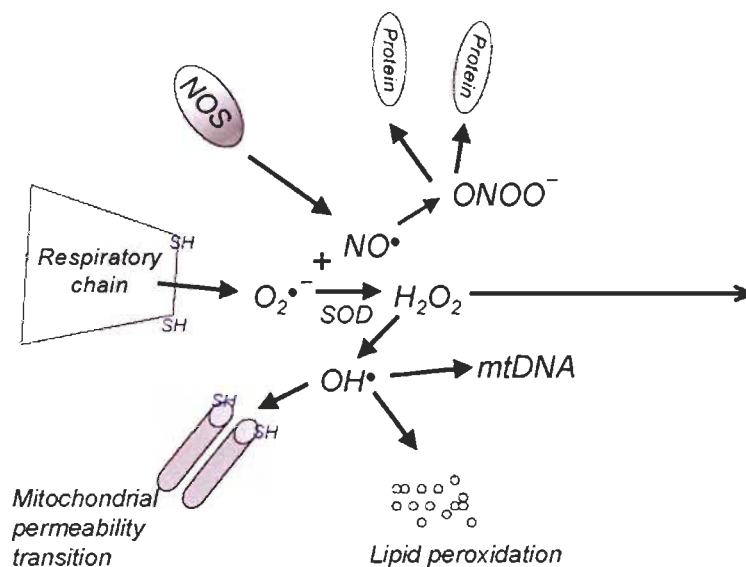


FIGURE 1.08 : Formation de ROS et RNS par la mitochondrie. (Szeto, 2006)

L' $ONOO^-$ peut inhiber l'activité de la SOD et la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui favorise la formation d' $O_2^{\bullet-}$ et d' $ONOO^-$. L' $O_2^{\bullet-}$ n'est pas fortement toxique, mais est une source de H_2O_2 qui est beaucoup plus dommageable lors de sa réaction avec le fer (Fukae et al., 2007). En temps normal, environ 1 % de l'oxygène est convertit en ROS. Par contre, une dysfonction au niveau du métabolisme énergétique entraîne une diminution en production d'adénosine triphosphate (ATP) et favorise la génération de ROS (Mandemakers et al., 2007). En présence de calcium, l'exposition aux ROS induit l'ouverture du pore de transition de perméabilité de la mitochondrie (MTP). Cela découple la phosphorylation oxydative et contribue à la cytotoxicité via le processus de nécrose ou d'apoptose (Beal, 2005).

L'auto-oxydation de la dopamine

Les neurones de la SNpc sont particulièrement exposés au stress oxydant puisque les métabolites de la DA peuvent agir en tant que toxines endogènes (Miyazaki and Asanuma, 2008). La toxicité de la DA résulte de la redistribution de la DA vésiculaire des vésicules synaptiques vers le cytosol. Par exemple, la

méthamphétamine provoque la libération de la DA vésiculaire et la mort neuronale suite à l'oxydation de la DA (Pubill et al., 2005). Les vésicules maintiennent les catécholamines à un état réduit grâce au pH bas tandis qu'à un pH alcalin comme dans le cytosol, la DA peut s'auto-oxyder en semi-quinones (perte d'un électron) et en quinones (perte de deux électrons) (Figure 1.09, réaction 2 et 3) (Sulzer and Zecca, 2000).

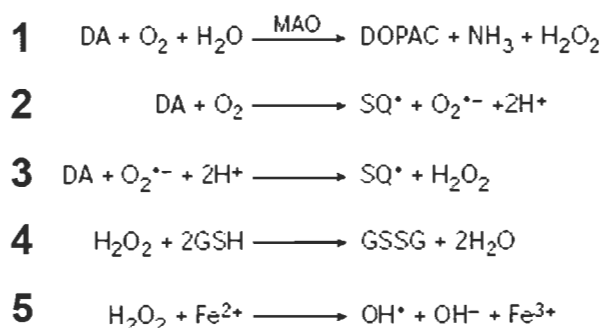


FIGURE 1.09 : Réactions d'oxydation de la dopamine (1, 2 et 3), réaction catalysée par la GSH (4) et réaction de Fenton (5). (Lotharius and Brundin, 2002)

L'oxydation spontanée favorise la génération de ROS puisque la DA produit aussi du H_2O_2 et de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Outre par auto-oxydation, la DA peut former du H_2O_2 et de l'acide dihydroxyphénylacétique (DOPAC) sous l'action de la monoamine oxydase (MAO) (Figure 1.09, réaction 1). La tyrosinase et la prostaglandine H synthase sont deux autres enzymes qui seraient aussi impliquées dans la synthèse de quinones de la DA (Asanuma et al., 2003).

La contribution du fer dans la MP

Le niveau de fer est plus élevé dans la SNpc que dans les autres régions du cerveau et son niveau augmente avec l'âge. L'ion ferreux a un rôle important dans le système dopaminergique puisqu'il est nécessaire pour la formation de DA par la tyrosine hydroxylase (TH) et pour le fonctionnement du transporteur de la DA (DAT). Par contre, il aurait un rôle important dans la pathogenèse de la MP puisque son niveau est augmenté dans les neurones de patients sévèrement affectés (Oakley et al., 2007; Riederer et al., 1989). Le fer est

surtout retrouvé sous forme de complexe avec la NM, qui possède deux sites de liaison et agit en tant que chélateur puissant pour protéger la cellule de sa toxicité (Ben-Shachar et al., 1991). Lorsque la quantité de fer surcharge les sites de la NM, le fer devient sous sa forme toxique (Figure 1.10). Il peut contribuer à la formation de radicaux hydroxyls (OH^\bullet), très toxiques, par la réaction de Fenton en présence de H_2O_2 , et donc favoriser la dégénérescence (Zecca et al., 2008) (Figure 1.09, réaction 5). De plus, le fer permet la conversion rapide de la DA semi-quinone en quinone, et les électrons ainsi générés entraînent une réduction des métaux, ce qui endommage le neurone. Aussi, le fer pourrait entraîner l'agrégation de l' α -SYN en favorisant un stress oxydant et participerait donc à la formation des CLs (Zecca et al., 2004). En résumé, le fer contribuerait en partie au stress oxydant, à la mort des neurones dopaminergiques et aux dépôts de CLs.

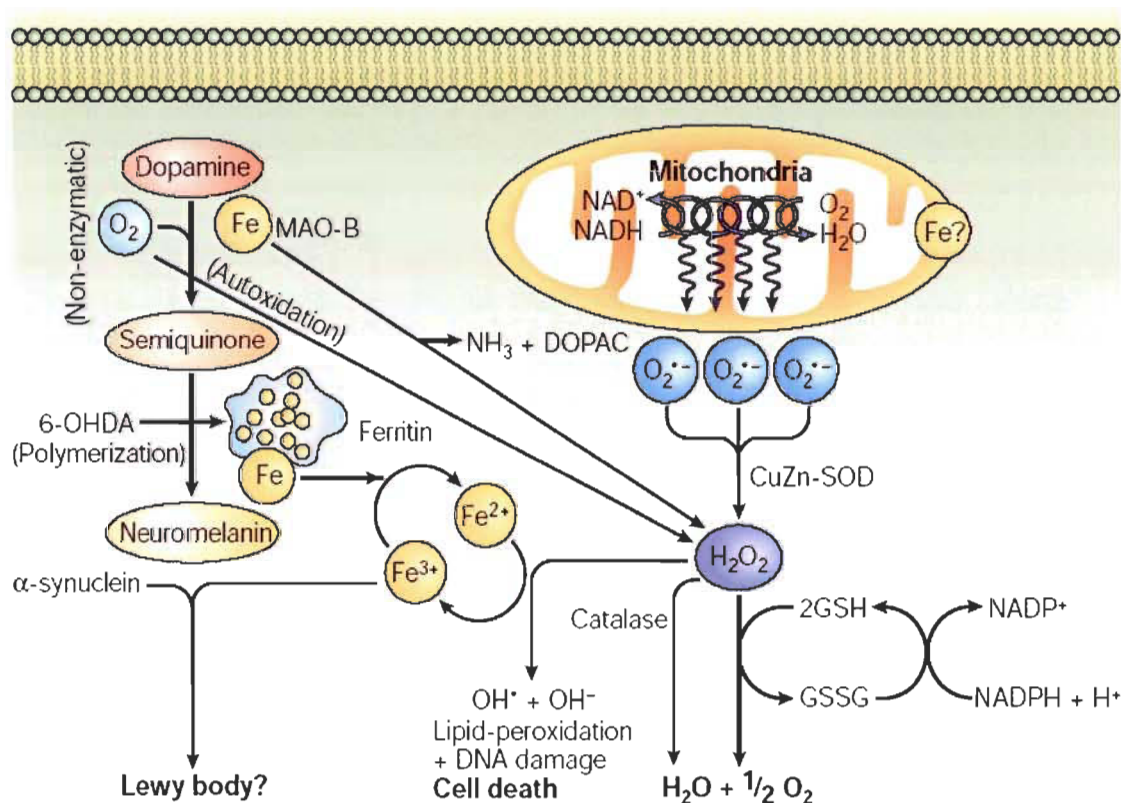


FIGURE 1.10 : Hypothèses sur l'implication du fer et du stress oxydant dans la MP. (Zecca et al., 2004)

L'augmentation de fer dans la SNpc de cerveaux de parkinsoniens pourrait résulter d'un mauvais fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou de mutations dans des gènes impliqués dans le métabolisme du fer (Zecca et al., 2004). En effet, une association entre le polymorphisme du gène de la transferrine, un transporteur du fer, et la susceptibilité de développer la MP a été démontrée (Borie et al., 2002).

Les mécanismes de défense antioxydante altérés

La cellule possède des enzymes antioxydantes qui peuvent, en temps normal, contrecarrer l'augmentation de ROS et de RNS (Figure 1.11).

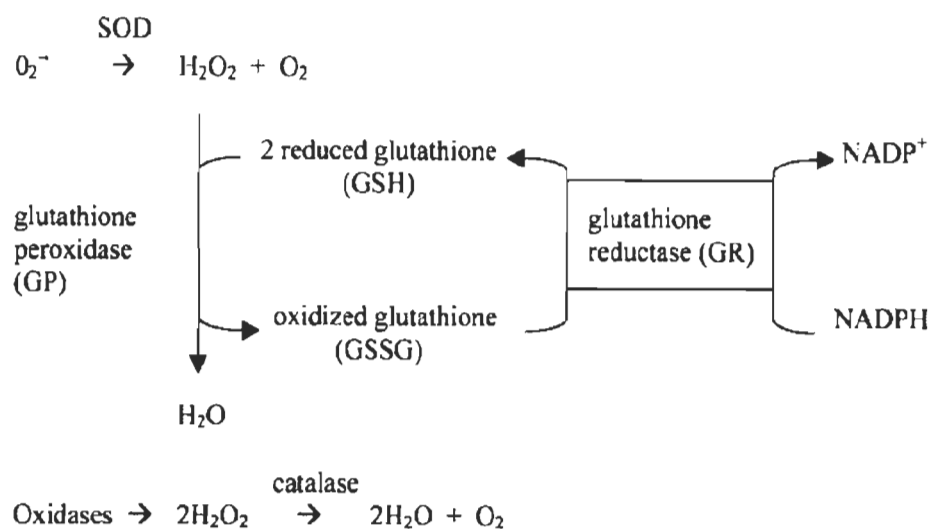


FIGURE 1.11 : Mécanismes de détoxification cellulaire par les enzymes antioxydantes. (Maier and Chan, 2002)

La catalase (Cat) catalyse la réaction de conversion du H₂O₂ en H₂O ainsi que la glutathione peroxydase (GPX) qui utilise la glutathione (GSH) comme substrat. Il a été démontré que l'activité de la Cat et de la GPX sont diminuées dans les cerveaux de patients atteints de la MP, ce qui favorise les dommages provoqués par les ROS (Ambani et al., 1975). L'activité de la SOD qui converti l'O₂^{•-} en H₂O₂ semble augmentée dans la MP, ce qui suggère un mécanisme de détoxification (Radunovic et al., 1997). Ces données mettent en évidence une altération des mécanismes antioxydants dans le cadre de la MP.

1.5.1.2 Les cibles du stress oxydant dans la MP

Les dommages provoqués par les ROS et les RNS

La production excessive de ROS et de RNS entraîne des dommages à divers constituants cellulaires comme l'ADN, les lipides et les protéines. Ces molécules sont fortement réactives puisqu'elles possèdent au moins un électron non-apparié sur leur couche externe, ce qui les rend très instables et favorise leur interaction avec d'autres molécules. Il a été démontré que les formes oxydées de guanine sont augmentées dans la SN de cerveaux parkinsoniens et l'ADN nucléaire ou mitochondrial endommagé par le stress oxydant peut modifier l'expression de plusieurs molécules. L'ADN mitochondrial est plus vulnérable au stress oxydant puisqu'il est directement exposé aux ROS libérés par la chaîne respiratoire. Puisque l'ADN mitochondrial code pour des composants de la chaîne respiratoire, l'accumulation de mutations peut induire des dysfonctions mitochondriales (Fukae et al., 2007; Lotharius and Brundin, 2002).

Les ROS attaquent les acides gras polyinsaturés (PUFAs) dans les membranes cellulaires et favorisent la peroxydation lipidique. Ce dernier est un mécanisme en chaîne qui provoque des dommages cellulaires. Il a été démontré que des produits de la peroxydation lipidique tels que le 4-hydroxynonénal (HNE), le malondialdéhyde et des hydroperoxydes lipidiques sont anormalement élevés dans les neurones dopaminergiques des individus parkinsoniens (Jenner, 2003). Les dommages aux lipides entraînent la perte de l'intégrité membranaire et augmentent la perméabilité aux ions comme le calcium, ce qui favorise l'excitotoxicité (Lotharius and Brundin, 2002).

Il a aussi été démontré que le niveau de protéines oxydées est augmenté dans le cerveau de parkinsoniens. Les dommages aux protéines peuvent résulter de la nitration de résidus tyrosine par l'ONOO⁻ formé. De cette façon, les ROS pourraient diminuer l'activité de la TH qui forme la DA et ainsi avoir un impact important dans le développement de la MP (Danielson and Andersen, 2008).

Les cibles des quinones dopaminergiques

Les quinones produites par l'oxydation de la DA interagissent avec les groupements nucléophiles de molécules bioactives dans le neurone. Par exemple, elles modifient de façon covalente les résidus cystéines, qui sont souvent les sites actifs de protéines fonctionnelles, pour former la 5-S-cystéinyl-DA (Vauzour et al., 2008) (Figure 1.12).

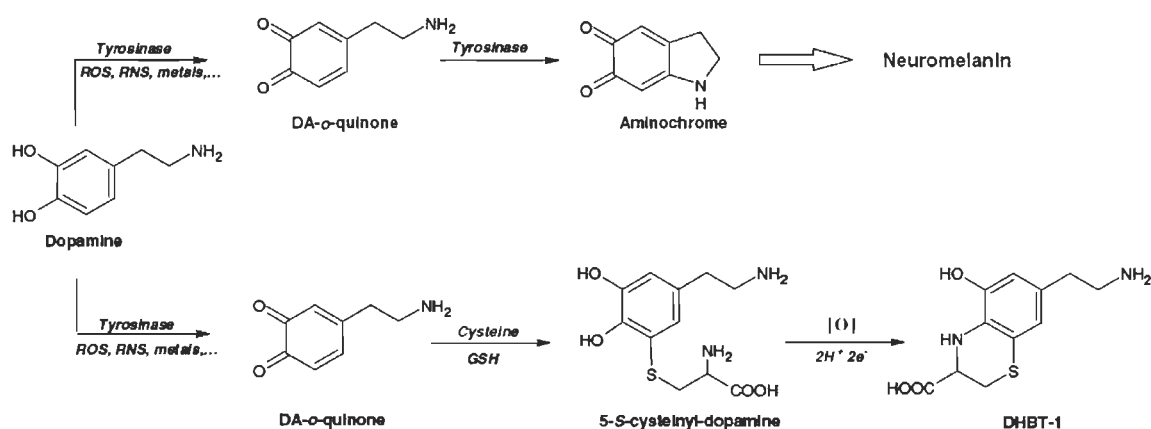


FIGURE 1.12 : Oxydation de la dopamine et formation de la 5-S-cystéinyl-DA. (Vauzour et al., 2008)

En conséquence, les quinones endommagent des protéines, comme la TH, qui deviennent non-fonctionnelles (Miyazaki and Asanuma, 2008). Les dérivés formés via l'oxydation de la 5-S-cystéinyl-DA, comme le DHBT-1, peuvent bloquer le complexe I mitochondrial de façon irréversible, interférer avec la fonction mitochondriale et favoriser la formation de ROS (Asanuma et al., 2003; Sulzer and Zecca, 2000). De plus, les quinones de la DA pourraient participer à la formation des CLs en favorisant la stabilisation des protofibrilles d' α -SYN (Danielson and Andersen, 2008; Dawson and Dawson, 2003). La figure 1.13 résume les cibles des quinones de la DA.

1.5.2 Le stress protéotoxique

Plusieurs maladies neurodégénératives, y compris la MP, partagent la caractéristique d'avoir une accumulation anormale de protéines endommagées

(Uversky, 2007). Ce processus est associé à la dysfonction et la mort des neurones.

dopaminergic neuron

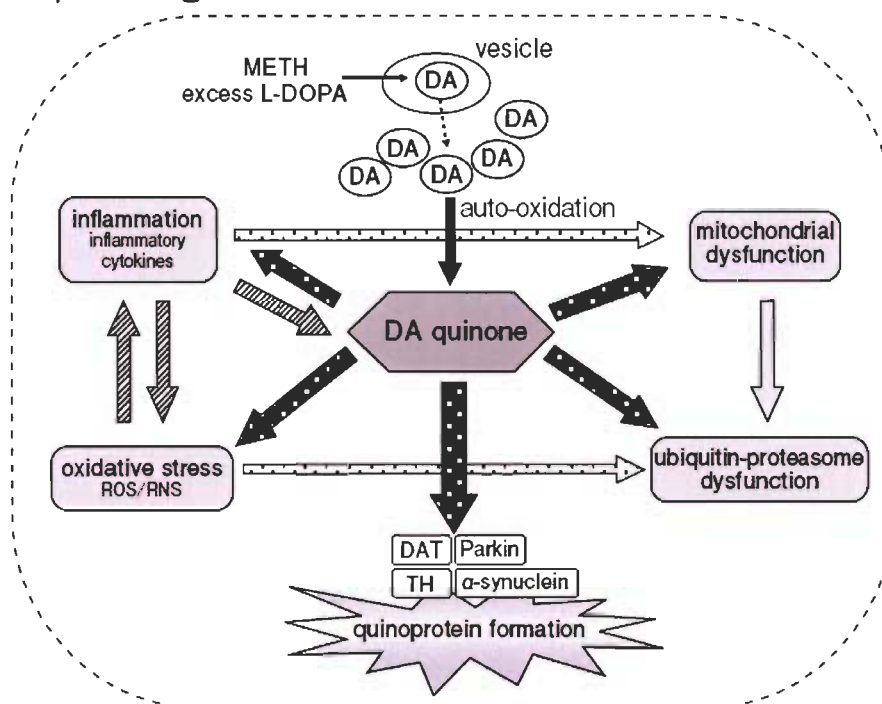


FIGURE 1.13 : Effet toxique des quinones de la DA dans la cellule. (Miyazaki and Asanuma, 2008)

1.5.2.1 L'agrégation protéique

Dans la MP, les protéines neuronales solubles ont tendance à se polymériser et à développer une conformation favorisant leur agrégation. Tel que discuté précédemment, l' α -SYN forme des agrégats fibrillaires sous l'influence du stress oxydant (Danielson and Andersen, 2008; Dawson and Dawson, 2003). Puisque l' α -SYN est le principal constituant des CLs et que ceux-ci sont caractéristiques de maladies neurodégénératives, l'agrégation protéique aurait un possible rôle dans le développement de la MP (Uversky, 2007). Un niveau élevé de stress oxydant ou une mauvaise élimination des protéines modifiées favorise l'accumulation de protéines endommagées et leur agrégation (Danielson and Andersen, 2008).

1.5.2.2 La dysfonction du système ubiquitine-protéasome

L'implication du système ubiquitine-protéasome (UPS) dans la pathogenèse de la MP provient de la découverte de mutations dans le gène codant pour une des enzymes impliquées dans le bon fonctionnement de l'UPS dans des cas de MP héréditaire. L'ubiquitine reconnaît les résidus hydrophobiques des protéines modifiées par l'oxydation et les marque pour leur digestion par le protéasome. Le protéasome, en limitant l'agrégation protéique et en éliminant des protéines potentiellement toxiques, agit en tant que défense antioxydante (Sulzer and Zecca, 2000). La perte de fonction des enzymes impliquées dans l'UPS favorise l'accumulation de protéines et la mort neuronale. Des évidences d'une déficience de l'UPS ont été démontrées dans des cerveaux de patients non-porteurs de mutations géniques, ce qui suggère un rôle dans la pathogenèse de la MP (McNaught et al., 2003).

1.5.3 Le rôle de l'inflammation

En plus du stress oxydant et d'une dysfonction de l'UPS, l'inflammation est soupçonnée d'avoir un rôle dans la pathogenèse de la MP. En effet, la présence de microglie activée et de marqueurs de l'inflammation ont été démontrés dans des cerveaux parkinsoniens (McGeer et al., 1988). En accord avec cette hypothèse, des études ont montré que le traitement avec des neurotoxines parkinsoniennes active la microglie et provoque la dégénérescence neuronale, et que l'utilisation de drogues anti-inflammatoires réduit cet effet (Yokoyama et al., 2008). Le moment et le mécanisme par lequel l'inflammation se développe dans la MP ne sont pas connus. L'inflammation serait plutôt reconnue comme un processus d'amplification immunitaire faisant suite à un choc initial tel que présenté à la figure 1.14 (Hunot and Hirsch, 2003). L'augmentation de l'enzyme NOS inductible dans la microglie pourrait être en partie responsable de l'effet nocif d'une augmentation de NO sur les neurones dopaminergiques (Liberatore et al., 1999).

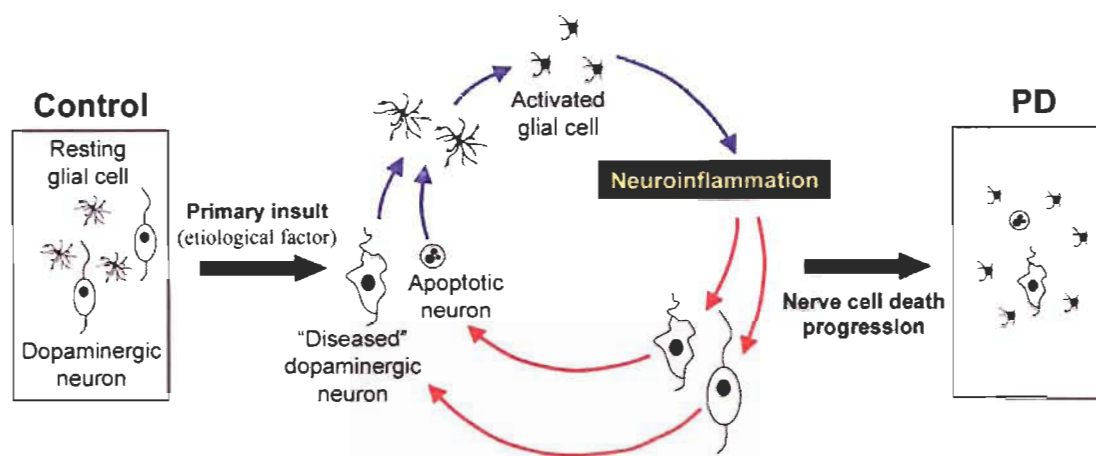


FIGURE 1.14 : Schéma du rôle de l'inflammation dans la pathogenèse de la MP. (Hunot and Hirsch, 2003)

1.5.4 Les cas héréditaires de la MP

Entre 5 et 10 % des cas de MP possèdent une étiologie familiale dont le début est précoce. À ce jour, des mutations sur cinq gènes différents ont été identifiées, et celles-ci semblent converger vers un état de stress oxydant (Figure 1.15).

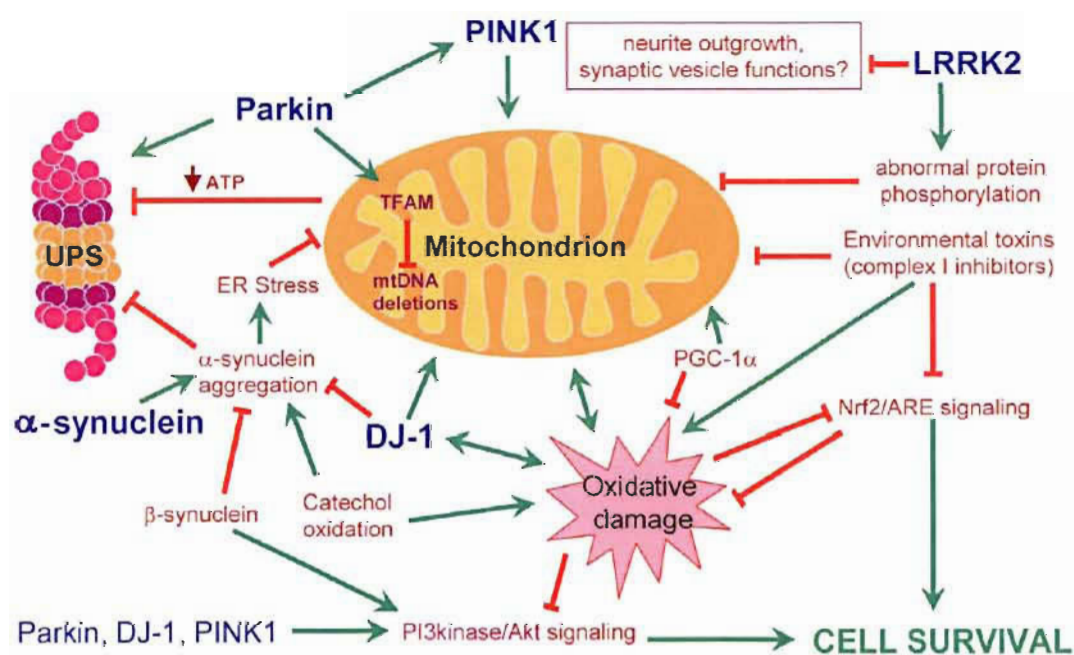


FIGURE 1.15 : Schéma des mutations géniques causant la MP. (Thomas and Beal, 2007)

1.5.4.1 Le gène de l' α -SYN

Le premier gène associé à une forme rare à début précoce de la MP, code pour la protéine α -SYN. Tel que présenté dans la partie 1.4.2, l' α -SYN est le principal constituant des CLs et aurait un rôle dans le transport synaptique des neurotransmetteurs. Trois mutations anti-sens (A53T, A30P et E46K) et une triplication d'une région dans le gène de l' α -SYN sont associées à une forme autosomique dominante de la MP (Cookson, 2009). Le mécanisme par lequel l'accumulation de la protéine malformée bouleverse le neurone dopaminergique jusqu'à provoquer la dégénérescence est mal connu. Il a été démontré que l'accumulation d' α -SYN bloque le trafic entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et cause un stress (Thomas and Beal, 2007). De plus, les mutations pourraient affecter la structure de l' α -SYN qui resterait dans un état de fibrillation intermédiaire toxique pour le neurone (Goldberg and Lansbury, 2000).

1.5.4.2 Le gène de la Parkin

Le gène de la Parkin code pour une protéine ubiquitine E3 ligase qui cible les protéines anormales pour leur dégradation dans le protéasome (Thomas and Beal, 2007). Les mutations dans le gène de la Parkin entraînent la forme juvénile autosomique récessive la plus courante de la MP par une perte de fonction de la protéine. Les mutations dans le gène de la Parkin auraient un impact sur l'accumulation de ses présumés substrats et favoriseraient la dégénérescence (Kitada et al., 1998). La Parkin serait aussi une protéine neuroprotectrice importante pour la survie des neurones dopaminergiques par son action sur l'activité du facteur de transcription nucléaire NF- κ B (Henn et al., 2007). Il est proposé que la Parkin s'associe à l' α -SYN pour la formation des CLs et que les mutations dans ce gène sont associées à des formes sans CLs, bien qu'il y ait certains cas de MP lié à la Parkin avec présence de CLs (Sasaki et al., 2004).

1.5.4.3 Le gène DJ-1

Des mutations de type perte de fonction dans le gène DJ-1 sont associées à de rares cas de formes autosomales récessives de la MP. Originellement connu comme oncogène, il a été proposé que DJ-1 aurait des fonctions antioxydantes et préviendrait l'agrégation d' α -SYN (Tan and Skipper, 2007; Thomas and Beal, 2007). Par exemple, la surexpression de DJ-1 protège des cellules en culture des dommages liés au stress oxydant induit par le H_2O_2 par un mécanisme d'auto-oxydation (Taira et al., 2004).

1.5.4.4 Le gène PINK1

Les mutations dans le gène PINK1 causent une forme familiale de MP à début précoce. Le rôle de la protéine codée par le gène PINK1 est peu connu, mais il a été démontré que PINK1 s'associe à la mitochondrie et contient un domaine kinase (Tan and Skipper, 2007). *In vivo*, la perte de fonction de PINK1 cause une dysfonction mitochondriale et la dégénérescence dopaminergique, ce qui suggère que les mutations géniques sont de type perte de fonction. PINK1 et la Parkin semblent interagir ensemble puisque le phénotype causé par la perte de fonction de PINK1 peut être rétabli par la surexpression de la Parkin (Clark et al., 2006; Yang et al., 2006).

1.5.4.5 Le gène LRRK2

Les mutations dans la kinase riche en leucine LRRK2 provoquent une forme dominante autosomique de la MP dont la prévalence varie fortement entre les populations (Deng et al., 2006). Le rôle précis de cette protéine est inconnu, mais la présence de plusieurs domaines suggère que LRRK2 possède une variété de fonctions et les mutations dans ces domaines entraînent un gain de fonction de la kinase. LRRK2 est le gène le plus récemment associé à la MP et

les substrats de cette kinase demeurent inconnus (Tan and Skipper, 2007; Thomas and Beal, 2007).

1.6 Les modèles pharmacologiques pour l'étude de la MP

1.6.1 Le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine et son métabolite actif

Dans les années 1980, 4 jeunes héroïnomanes ont développé un syndrome parkinsonien dans la semaine suivant l'injection d'une héroïne synthétique. Celle-ci était contaminée par le 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP), un analogue de l'opioïde 1-méthyl-4-phényl-4-propionoxy-piperidine (MPPP), et peut être synthétisé lors de sa production illégale (Figure 1.16) (Langston et al., 1983).

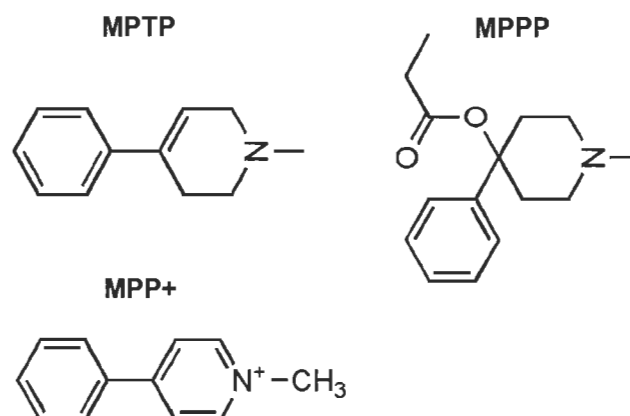


FIGURE 1.16 : Structures chimiques du MPTP, du MPPP et du MPP+. (Bove et al., 2005)

Puisqu'il induit un syndrome parkinsonien sévère et irréversible, le MPTP est utilisé comme modèle pour l'élucidation des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la MP. Par exemple, son utilisation chez les singes a apporté de nouvelles connaissances sur l'implication d'une dysfonction mitochondriale dans la pathogenèse de la MP (Bove et al., 2005; Schober, 2004).

1.6.1.1 L'internalisation et la conversion du MPTP

Le MPTP est une molécule très lipophile qui traverse rapidement la BHE (Figure 1.17A).

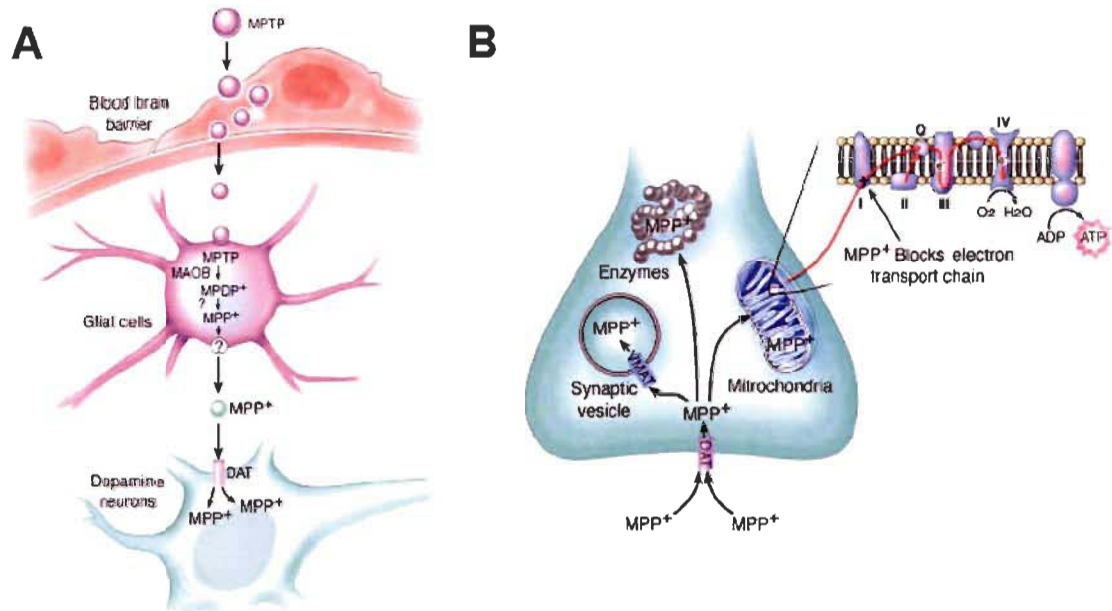


FIGURE 1.17 : Internalisation (a) et mode d'action (b) du MPTP. (Dauer and Przedborski, 2003)

Les cellules gliales et les neurones sérotoninergiques possèdent la MAO-B qui oxyde le MPTP en 1-méthyl-4-phényl-2,3-dihydropyridinium (MPDP⁺). De façon spontanée, le MPDP⁺ est converti en sa forme active, le 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP⁺) (Figure 1.16), qui est libéré dans l'espace intercellulaire par un mécanisme inconnu. Étant une molécule polaire, le MPP⁺ doit entrer dans le neurone par des transporteurs tels que le DAT, les transporteurs sérotoninergiques (SET) et de la norépinéphrine (NET) (Dauer and Przedborski, 2003).

1.6.1.2 Le mode d'action du MPP⁺

Dans le neurone dopaminergique, le MPP⁺ induit la mort par au moins trois mécanismes distincts (Figure 1.17B). 1) Lorsqu'il se lie au transporteur

monoamine vésiculaire 2 (VMAT-2), le MPP⁺ est séquestré dans des vésicules, ce qui redistribue la DA dans le cytosol et favorise le stress oxydant dépendant de l'oxydation de la DA (Lotharius and Brundin, 2002). 2) De plus, le MPP⁺ peut interagir avec des enzymes cytosoliques porteuses de charges négatives et les rendre inactives. 3) Le MPP⁺ peut aussi affecter la phosphorylation oxydative mitochondriale en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire (Dauer and Przedborski, 2003). En plus d'entraîner une diminution dans la production d'ATP, l'inhibition du complexe I par le MPP⁺ stimule la production de ROS. Dans des cellules en culture, le MPP⁺ semble augmenter l'ouverture du MPT, ce qui augmenterait la formation de ROS et entraînerait la diminution de l'activité de la GSH (Kalivendi et al., 2003; Lee et al., 2006). De plus, la mort induite par le MPP⁺ implique une diminution de l'expression de molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et une augmentation de l'expression de molécules pro-apoptotiques comme Bax, en plus d'activer les caspases et augmenter la fragmentation de l'ADN, des caractéristiques propres à la mort apoptotique (Lipman et al., 2006).

1.6.2 La 6-hydroxydopamine

La 6-hydroxydopamine (6-OHDA) est la première neurotoxine dopaminergique à avoir été découverte et utilisée pour reproduire un modèle parkinsonien (Jonsson, 1980). Des évidences suggèrent que la 6-OHDA est un facteur endogène toxique dans la pathogenèse de la MP. En effet, la présence de 6-OHDA a été reportée dans des cerveaux et l'urine de patients parkinsoniens (Andrew et al., 1993).

1.6.2.1 L'internalisation de la 6-OHDA

La 6-OHDA partage des similarités structurales avec la DA et la norépinéphrine et possède une certaine affinité pour le DAT et le NET. Par contre, la 6-OHDA ne traverse pas la BHE et doit donc être injectée stéréotaxiquement dans le

cerveau de façon unilatérale. De cette façon, le côté intact devient un contrôle (Bove et al., 2005; Schober, 2004).

1.6.2.2 Le mode d'action de la 6-OHDA

La 6-OHDA détruit les neurones cathécolaminergiques par une combinaison de mécanismes. Il est connu que la 6-OHDA dissoute dans un milieu alcalin s'oxyde rapidement, ce qui occasionne du H_2O_2 et des quinones toxiques (Figure 1.18) (Soto-Otero et al., 2000). De plus, la 6-OHDA pourrait inhiber le complexe I et IV de la chaîne respiratoire et favoriser le stress oxydant. La 6-OHDA est toxique dans une variété de cellules en culture par l'activation de voies apoptotiques (Lipman et al., 2006; Saito et al., 2007; Wu et al., 1996) et par la formation de ROS en diminuant de l'activité de la SOD (Choi et al., 1999).

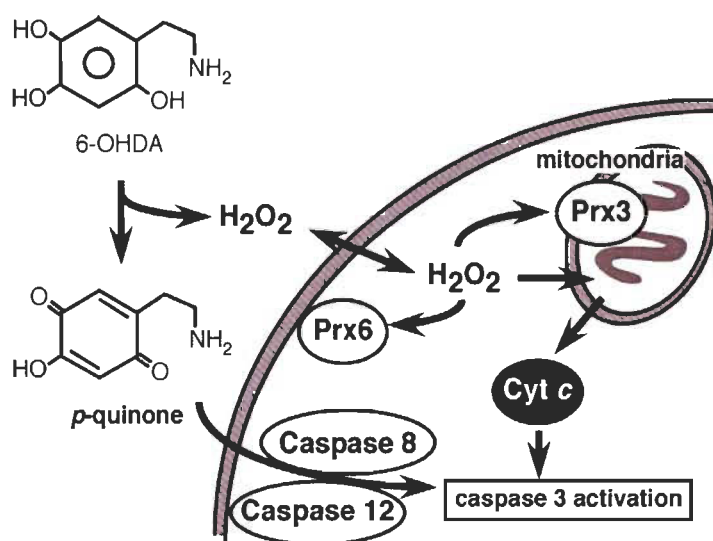


FIGURE 1.18 : Mécanisme d'action neurotoxique de la 6-OHDA. (Saito et al., 2007)

1.6.3 Les autres modèles pharmacologiques pour l'étude de la MP

Les deux neurotoxines présentées ci-dessus sont les plus couramment utilisées pour produire des modèles parkinsoniens chez l'animal. Par contre, d'autres approches telles que l'utilisation de toxines environnementales (la roténone, le

paraquat et le maneb) permettent aussi l'étude de la MP (Bove et al., 2005). En général, ces substances possèdent la même propriété, soit celle d'inhiber le fonctionnement normal de la chaîne respiratoire mitochondriale.

1.7 Les traitements actuels de la MP

1.7.1 Le traitement pharmacologique

La pharmacothérapie la plus efficace et la plus utilisée est le traitement à la **lévodopa** (L-dopa). L-dopa est l'abréviation de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine, un intermédiaire qui, après décarboxylation, forme la DA à partir de la tyrosine. L'utilisation de la L-dopa provient du fait que contrairement à la DA, la L-dopa a la capacité de traverser la BHE et d'être par la suite transformée en DA pour finalement suppléer à la déplétion de cette dernière. Très peu de temps après sa découverte comme traitement, des effets néfastes ont été associés au traitement à long terme, soit des mouvements involontaires très encombrants nommés dyskinésies. De plus, après quelques années de traitement, un pourcentage important des patients ont des fluctuations motrices nommées périodes «on-off» pendant lesquelles le traitement n'a plus son effet anti-parkinsonien (Nutt, 2008).

Afin de limiter ce phénomène, la L-dopa est administrée avec des molécules qui favorisent sa disponibilité et diminuent l'activité d'enzymes impliquées dans son métabolisme. Le traitement à la L-dopa est donc conjugué avec des **inhibiteurs de la dopa décarboxylase** (carbidopa et benserazide), des **inhibiteurs de la MAO-B** (selegiline) ou des **inhibiteurs de la cathécolamine-O-méthyltransférase** (COMT) (tocapone et entacapone) (Fahn, 2008).

L'utilisation d'**agonistes dopaminergiques** (pramipexole, ropinirole) permet aussi le renversement des symptômes parkinsoniens en reproduisant l'effet de la DA sur ses récepteurs. L'activation des récepteurs dopaminergiques de type

D1 serait à la base de l'induction des dyskinésies puisque les agonistes dopaminergiques de type D2 tendent à avoir un effet moindre (Nutt, 2008). Par contre, ils sont souvent contre-indiqués puisqu'ils provoquent des effets secondaires néfastes comme des hallucinations et de la confusion (Weintraub et al., 2008b).

1.7.2 La neurochirurgie

Bien avant la découverte de la L-dopa, l'ablation du thalamus ou du pallidum était le principal traitement utilisé pour la MP. Depuis quelques années, un nouveau traitement chirurgical a été introduit : la stimulation cérébrale profonde (DBS) des noyaux sous-thalamiques. Comme l'ablation chirurgicale, la DBS réduit l'activité neuronale dans les tissus avoisinants l'électrode, permettant ainsi une réduction de la dose de L-dopa et réduisant aussi les dyskinésies (Limousin et al., 1998). Par contre, ce traitement est très dispendieux et donc peu accessible.

1.7.3 La thérapie préventive

Alors que les traitements présentés ci-dessus sont efficaces pour contrecarrer les symptômes de la MP, ils ne peuvent pas compenser pour les neurones endommagés et ne peuvent pas les réparer ou les remplacer. L'élucidation des mécanismes impliqués dans la neurodégénérescence des neurones dopaminergiques dans la MP aura des impacts importants sur la génération de nouvelles thérapies curatives. Pour l'instant, l'étude de molécules pouvant diminuer ou retarder la mort des neurones dopaminergiques est importante. La neuroprotection permet de préserver les neurones restants et de mieux comprendre la maladie. Plusieurs composés sont étudiés, et notre laboratoire s'intéresse principalement aux molécules à caractère estrogénique telles que présenté plus loin dans ce travail.

1.8 Les facteurs de transcription et la transmission dopaminergique

Les effets de la DA sont accomplis par son interaction avec les récepteurs membranaires dopaminergiques couplés à une protéine G. Suite à l'activation de kinases, la liaison de la DA à son récepteur membranaire convertit le signal en changements à long terme par son action sur divers facteurs de transcription. Ceux-ci semblent être importants lors du développement ou dans la réponse adaptative au stress. Récemment, des données ont amené les chercheurs à supposer le rôle des facteurs de transcription du groupe NR4A et du récepteur rétinoïde X (RXR) dans le système dopaminergique (Levesque and Rouillard, 2007). De cette hypothèse découle mon projet de maîtrise en collaboration avec le Dr Claude Rouillard.

1.8.1 Le facteur de transcription Nur77

En 1988, Milbrandt a découvert le gène de Nur77 comme gène induit lors de la différenciation des cellules PC12 en neurones dopaminergiques par le facteur de croissance neuronal (NGF) (Milbrandt, 1988). L'analyse de la séquence de ce gène a permis de démontrer qu'il code pour un récepteur nucléaire agissant comme facteur de transcription (Hazel et al., 1988). Nur77, aussi connu sous le nom de NGFI-B et TR3, appartient au sous-groupe NR4A des récepteurs nucléaires. Ce groupe possède deux autres membres, Nurr1 et NOR-1, et ces trois récepteurs sont dits orphelins puisque leurs ligands demeurent inconnus (Hsu et al., 2004). Ils sont exprimés dans une variété de tissus et impliqués dans plusieurs processus biologiques. La caractéristique particulière de ces récepteurs est qu'ils sont des gènes à induction rapide (IEGs) par divers signaux résumés à la figure 1.19 et ils auraient donc une habileté à répondre rapidement à des changements dans l'environnement cellulaire (Maxwell and Muscat, 2006). Par hybridation *in situ*, l'expression de ces trois IEGs dans diverses structures du cerveau a été démontrée, et leur distribution diffère selon le stade développemental (Zetterstrom et al., 1996).

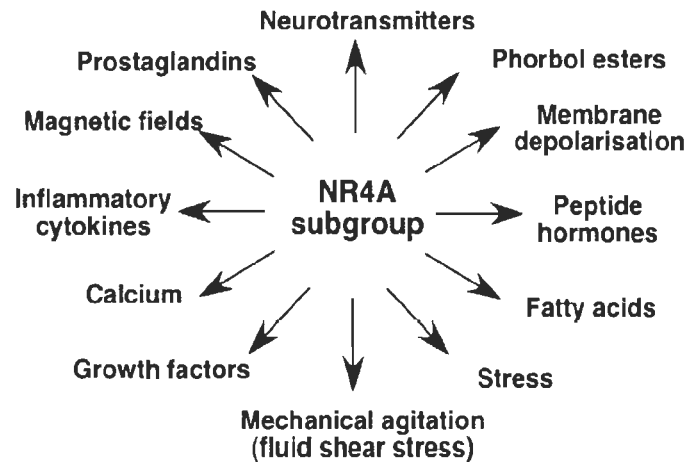


FIGURE 1.19 : Résumé des stimuli qui induisent l'expression des membres du groupe NR4A. (Maxwell and Muscat, 2006)

1.8.1.1 La structure de Nur77

Faisant partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, Nur77 possède une région amino-terminale variable (A/B) qui code pour une fonction activatrice (AF-1), suivie d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD), d'une région charnière (D), d'un domaine de liaison du ligand (LBD), d'une région AF-2 et d'une région carboxyl-terminale (Davis et al., 1993; Moll et al., 2006) (Figure 1.20). Les deux AF sont des sites de liaison pour les cofacteurs nécessaires pour la transcription de gènes cibles.

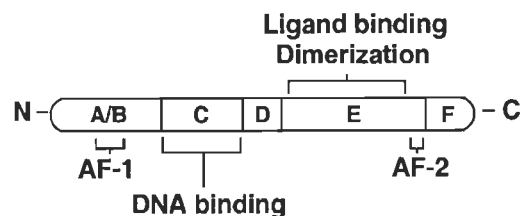


FIGURE 1.20 : Représentation de la structure d'un récepteur nucléaire. (Aranda and Pascual, 2001)

1.8.1.2 Nur77 et sa liaison à l'ADN

Nur77 se lie à l'ADN sous forme monomérique, homodimérique ou hétérodimérique (Figure 1.21 a).

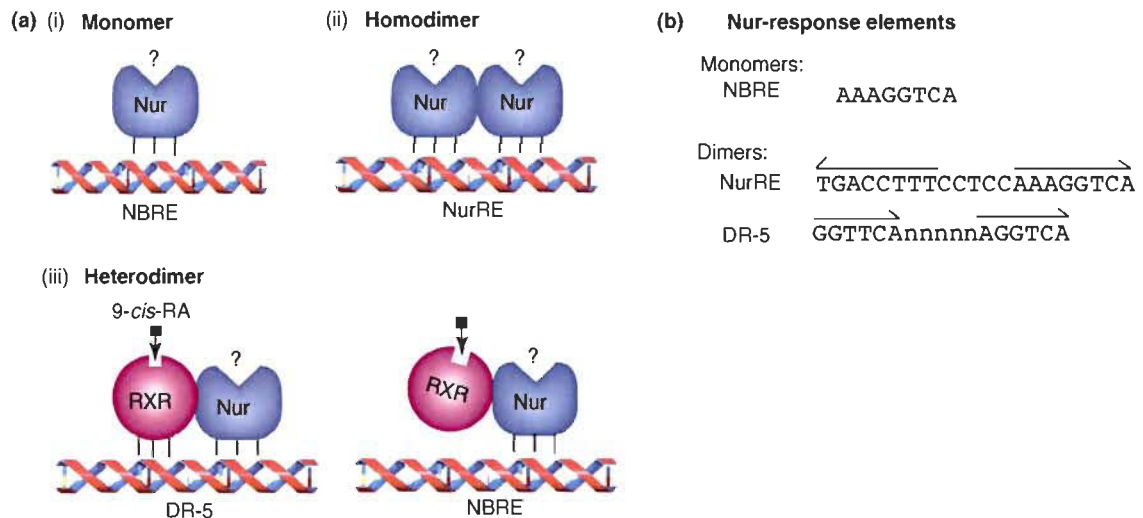


FIGURE 1.21 : Différents modes de liaison de Nur77 (a) et les éléments de réponses (b). (Levesque and Rouillard, 2007)

En tant que monomère, Nur77 se lie à l'élément de réponse NBRE qui contient les nucléotides 5'-AAAGGTCA-3'. En plus de se lier à l'ADN en tant qu'homodimère sur la séquence NurRE, Nur77 peut former un hétérodimère avec le RXR et ce complexe peut être activé par les ligands du RXR (Maruyama et al., 1998) (Figure 1.21 b). Outre le RXR qui est son principal partenaire d'hétérodimérisation, Nur77 peut s'hétérodimériser avec d'autres récepteurs orphelins tels que COUP-TF (Hsu et al., 2004).

1.8.1.3 Nur77 l'agent inducteur d'apoptose et de survie cellulaire

Nur77 dans la sélection négative des thymocytes

Le premier indice reliant Nur77 à l'apoptose a été identifié en 1994 lors de la découverte de l'induction de Nur77 dans la sélection négative des thymocytes (Woronicz et al., 1994). Dans les thymocytes, l'augmentation de calcium

favorise l'activité transcriptionnelle de Nur77 et son action pro-apoptotique (Woronicz et al., 1995).

Les voies de survie et d'apoptose de Nur77 dans le cancer

Certains facteurs de croissance et mitogènes peuvent induire l'expression de Nur77. Par conséquent, Nur77 est surexprimé dans une variété de cellules cancéreuses incluant les cellules de poumon, de la prostate, du sein et du colon (Kolluri et al., 2003). Nur77 serait également responsable de l'apoptose induite par des agents chimio-thérapeutiques suite à sa translocation vers le cytoplasme (Li et al., 2000; Shin et al., 2004; Wilson et al., 2003). Nur77 agit donc dans les cellules cancéreuses en tant qu'agent double : dans le noyau, Nur77 favorise la survie cellulaire alors que dans le cytoplasme, il agit comme inducteur d'apoptose (Figure 1.22) (Moll et al., 2006; Zhang, 2007).

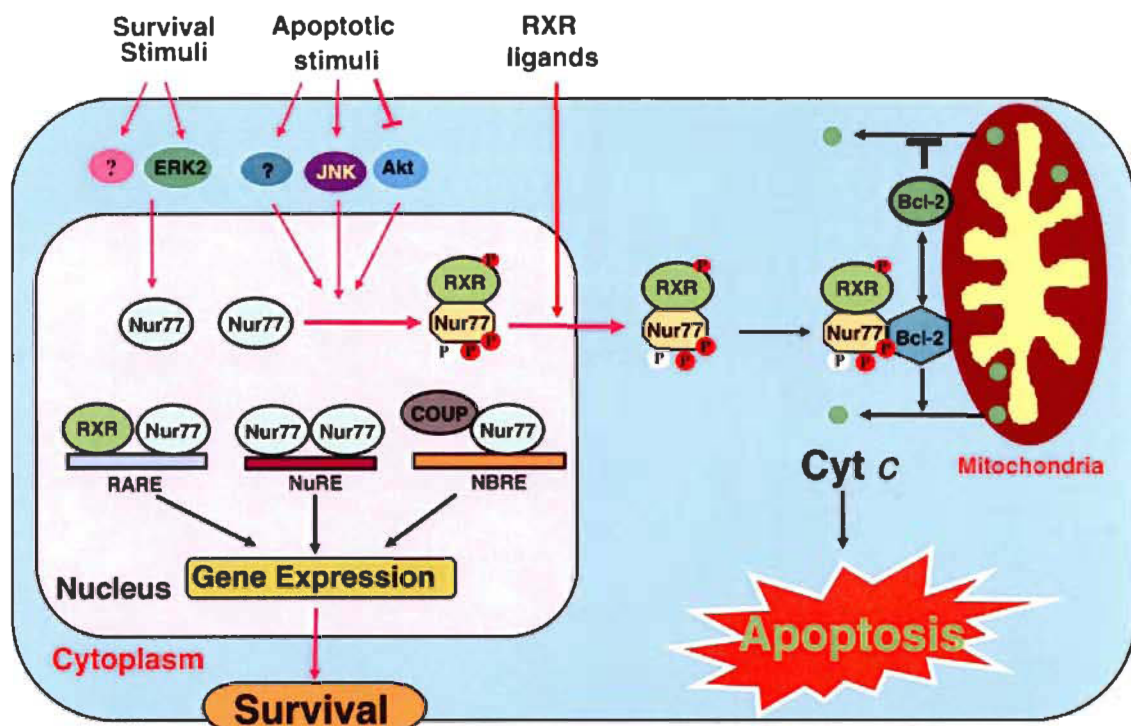


FIGURE 1.22 : Schéma du double rôle de Nur77 dans les cellules cancéreuses. (Moll et al., 2006)

En effet, en réponse à des agents apoptotiques, Nur77 effectue une translocation vers le cytoplasme, s'associe à la mitochondrie et entraîne

l'apoptose suite à la libération de cytochrome c (Li et al., 2000). Il fut démontré que son partenaire d'hétérodimérisation, le RXR, est nécessaire pour la migration de Nur77 vers le cytoplasme lors d'un stimulus apoptotique. En effet, le RXR serait un partenaire actif puisqu'il permettrait la translocation de Nur77 à l'aide d'une séquence d'export nucléaire (NES) dans son LBD. Le NES serait actif lors de la dimérisation des récepteurs par leurs DBD en l'absence de ligand et la présence d'un stimulus apoptotique. Par contre, il serait silencieux lors de la dimérisation par des interfaces dans les LBDs lors de la liaison d'un ligand au RXR. De cette façon les ligands du RXR pourraient empêcher la translocation de Nur77 (Cao et al., 2004). Dans le cytoplasme, l'interaction entre Nur77 et la molécule anti-apoptotique Bcl-2 a été identifiée comme événement clef dans l'effet apoptotique de Nur77. Nur77 devient le partenaire actif en se liant à la région N-terminale de Bcl-2 entre les domaines BH3 et BH4. Cette interaction résulte en un changement conformationnel de Bcl-2 qui, par l'exposition de son domaine BH3, devient une molécule pro-apoptotique (Lin et al., 2004).

Récemment, une autre partie du mécanisme d'action de Nur77 a été élucidée. Dans le noyau, Nur77 pourrait favoriser la survie cellulaire en augmentant l'activité anti-apoptotique de NF- κ B (de Leseleuc and Denis, 2006). Dans le cytoplasme, il a été démontré que Nur77 interagit fortement avec Bcl-B, une nouvelle molécule apparentée à Bcl-2 qui est retrouvée dans les lignées cellulaires de myélome, afin de la convertir en molécule pro-apoptotique (Luciano et al., 2007). Par ailleurs, Nur77 pourrait interagir avec le réticulum endoplasmique et initier la libération de calcium (Liang et al., 2007). De cette façon, Nur77 pourrait induire l'apoptose de cellules cancéreuses en causant un stress au réticulum endoplasmique parallèlement à son effet au niveau de la mitochondrie.

Nur77 dans l'apoptose neuronale

Puisque le processus de mort par apoptose nécessite la synthèse protéique, les IEGs pourraient y participer en régulant la transcription de gènes suicides. En

effet, les IEGs c-jun et c-fos sont nécessaires à la mort neuronale apoptotique (Estus et al., 1994). Dans le cas de Nur77, il a été démontré que son expression augmente dramatiquement lors du traitement à l'acide kaïnique, un agent neurotoxique reconnu pour induire l'épilepsie et des dommages dans des parties spécifiques du cerveau (Honkaniemi and Sharp, 1999) et lors de dommages hypoxiques/ischémiques dans le cerveau (Walton et al., 1999). Aussi, la phosphorylation de Nur77 et son activité transcriptionnelle sont impliquées dans le processus de mort neuronale induite par la substance P (Castro-Obregon et al., 2004). Ces indices supportent donc le rôle de Nur77 au niveau de l'apoptose neuronale.

1.8.1.4 Les modifications post-transcriptionnelles de Nur77

Puisque le ligand endogène de Nur77 demeure inconnu, il est proposé que les activités de Nur77 sont régulées par des modifications post-transcriptionnelles en plus de par la liaison de ligands à son partenaire d'hétérodimérisation (Wingate and Arthur, 2006). La principale modification connue est la phosphorylation et serait en lien avec la localisation cellulaire de Nur77 et ses activités transcriptionnelles. Tout d'abord, il a été démontré que Nur77 est fortement phosphorylé dans les PC12 stimulée par le NGF puisque la migration de la protéine sur gel dévoile une bande diffuse. Nur77 est phosphorylé surtout dans le cytoplasme et cet état revient à la normale après le traitement avec des phosphatases (Fahrner et al., 1990).

Les résidus phosphorylés sont principalement des sérines et auraient des effets variés (Hazel et al., 1991). Par exemple, la phosphorylation de la sérine 350 et 316 semblent diminuer l'affinité de Nur77 pour l'ADN et favoriser sa translocation vers le cytoplasme (Hirata et al., 1993; Katagiri et al., 2000; Pekarsky et al., 2001). Aussi, l'activation de kinases régulées par des signaux extracellulaire (ERK) favoriserait la localisation nucléaire de Nur77 (Jacobs et al., 2004; Jacobs and Paulsen, 2005).

1.8.1.5 Le rôle de Nur77 dans le système dopaminergique

Le rôle de Nur77 dans le système mésolimbique et la dépendance

Les drogues d'abus provoquent une forte libération de DA dans le noyau accumbens et activent la voie mésolimbique de la récompense. Il a été démontré que les niveaux d'ARNm de Nur77 peuvent être changés par certaines drogues qui affectent cette voie et que Nur77 pourrait avoir un effet sur la dépendance. Par exemple, alors que le niveau de Nur77 est bas dans le noyau accumbens, caudé et putamen, l'administration de cocaïne et de morphine augmente son expression (Werme et al., 2000).

Le rôle de Nur77 dans l'effet des drogues antipsychotiques

L'expression de Nur77 est aussi modulée par les agonistes dopaminergiques utilisés pour le traitement contre la schizophrénie. En effet, l'halopéridol, un antipsychotique typique antagoniste des récepteurs D2, augmente l'expression de Nur77 dans les neurones qui contiennent l'enképhaline (ENK) dans le striatum (Beaudry et al., 2000). D'autre part, l'administration d'anti-psychotiques typiques et atypiques entraîne un patron d'expression de Nur77 différent. Ce fait est intéressant puisque les drogues typiques, qui sont reconnues pour induire des symptômes extrapyramidaux, les catalepsies, augmentent fortement l'expression de Nur77 par rapport aux drogues atypiques (Maheux et al., 2005).

Le rôle de Nur77 dans la voie nigro-striée et le mouvement

Dans les rats dénervés suite au traitement à la 6-OHDA, il a été démontré que le nombre de cellules qui expriment Nur77 augmente dans le striatum du côté lésé, et que l'administration répétée de L-dopa induit une augmentation de l'expression de Nur77 du côté contra-latéral (St-Hilaire et al., 2003, 2005). De plus, la lésion favorise le pourcentage de cellules qui contiennent l'ENK et Nur77 par rapport à la dynorphin (DYN), alors que l'inverse est observé lors de l'administration de L-dopa ou la co-administration d'agonistes D1 et D2. Aussi,

Nur77 semble avoir un rôle dans le développement des dyskinésies induite par la L-dopa puisque le knock-out de Nur77 semble aggraver les dyskinésies chez des souris (St-Hilaire et al., 2006) et ces souris présentent une activité locomotrice spontanée augmentée (Gilbert et al., 2006). La figure 1.23 résume ces résultats intrigants.

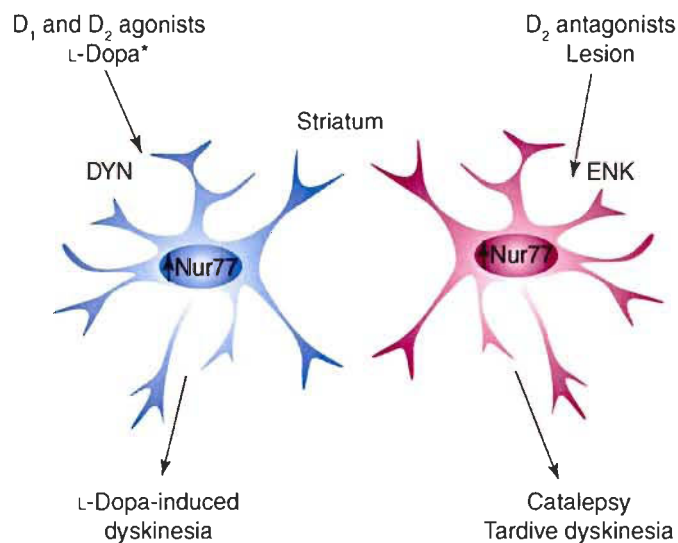


FIGURE 1.23 : Effet de modifications de la transmission dopaminergique sur l'expression de Nur77. (Levesque and Rouillard, 2007)

Le rôle de Nur77 dans les réactions biochimiques de la DA

Dans les souris où il y a eu knock-out du gène Nur77, plusieurs composantes des neurones dopaminergiques sont modifiées. Tout d'abord, le niveau de l'ARNm de la TH et son activité sont augmentés dans la SNpc. De plus, la DOPAC (un métabolite de la DA) est augmentée, ce qui indique une augmentation du turn-over de la DA (Gilbert et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'ablation génétique de Nur77 modifie les activités biochimiques des neurones dopaminergiques.

1.8.2 Le RXR

Plusieurs études démontrent que les activités de Nur77 dans le système dopaminergique impliquent le complexe hétérodimérique Nur77/RXR (Levesque

and Rouillard, 2007). Les différentes isoformes du RXR (α , β et γ) sont fortement exprimées dans le cerveau, suggérant un possible rôle à ce niveau. Par ailleurs, il a été démontré que des mutations géniques dans le RXR entraînent des défauts de locomotion chez des souris et ce serait causé par une défaillance du système dopaminergique mésolimbique (Krezel et al., 1998).

1.8.2.1 Les partenaires d'hétérodimérisation du RXR

L'affinité à l'ADN et la régulation de la transcription est augmentée par l'hétérodimérisation du RXR avec ses partenaires. Le RXR contribue à la signalisation par les rétinoïdes, comme le 9-cis-RA, par son homodimérisation ou son association avec le récepteur de l'acide rétinoïde (RAR). Le RXR forme aussi des complexes avec le récepteur de la vitamine D et le récepteur de l'hormone thyroïdique en plus de Nur77 (Ahuja et al., 2003; Rastinejad, 2001).

1.8.2.2 La liaison des ligands à l'hétérodimère RXR/Nur77

Dans des conditions basales, les complexes transcriptionnels RAR-RXR prédominent. Par contre, l'induction de l'expression de Nur77 pourrait favoriser la formation des hétérodimères Nur77/RXR. Puisque le RXR est un partenaire actif dans ces complexes, les cellules pourraient donc devenir sensibles aux ligands du RXR. De cette façon, les ligands du RXR empêcheraient la translocation de Nur77, ce qui a déjà été démontré avec le 9-cis-RA (Cao et al., 2004). D'autres molécules comme des acides gras et un anti-inflammatoire non-stéroïdien (etodolac) pourraient aussi se lier au RXR (Zeng and Zhang, 2007).

1.9 Les molécules d'intérêt dans ce mémoire

Trois molécules seront présentées dans cette partie du mémoire puisqu'elles sont à l'étude comme molécules neuroprotectrices et font partie intégrante de

mon projet de recherche. Par contre, il est à noter que d'autres molécules neuroprotectrices pourraient également avoir un avenir prometteur.

1.9.1 L'acide docosahexaénoïque

1.9.1.1 Généralités

Les bienfaits d'une alimentation riche en acides gras oméga-3 sur la santé est bien établie depuis plusieurs années. L'acide docosahexaénoïque (DHA, 22 :6n-3) est un PUFA faisant partie de la famille des oméga-3. Puisque l'organisme ne peut pas synthétiser des acides gras à longues chaînes *de novo*, le DHA doit être ingéré soit directement dans l'alimentation ou à partir de son précurseur, l'acide α -linoléïque (LNA) (Figure 1.24).

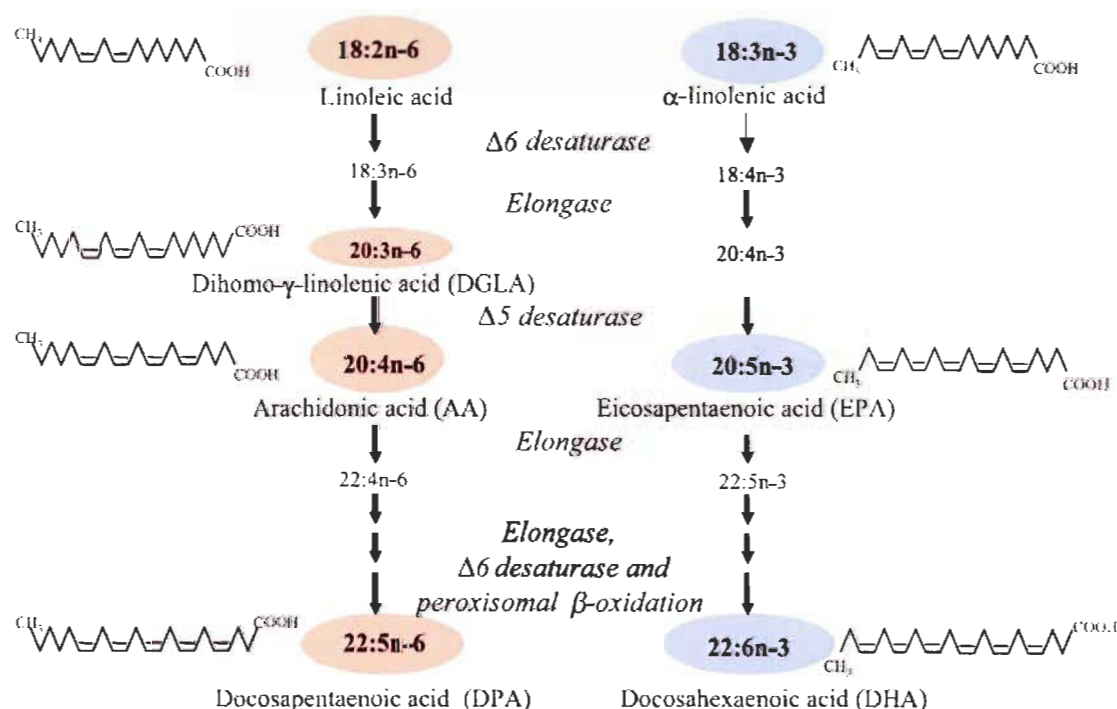


FIGURE 1.24 : Schéma de la conversion de LNA en DHA.
(Alessandri et al., 2004)

Le LNA est synthétisé par certaines plantes, des algues, des bactéries et des champignons. Dans la plupart des animaux marins, ce précurseur est

transformé en DHA, et la quantité de DHA diffère selon leur alimentation (Saito et al., 1999).

Le DHA est surtout retrouvé dans les poissons gras comme la morue et des fruits de mer comme la pétoncle (Youdim et al., 2000). La conversion de LNA en DHA dans le foie est extrêmement limitée chez l'humain et c'est pourquoi il est préférable d'aller chercher directement le DHA dans l'alimentation. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'estrogène semble augmenter la conversion du DHA et que la concentration en DHA dans le plasma des femmes est plus élevée que chez les hommes (Williams and Burdge, 2006). Le DHA est surtout reconnu pour ses propriétés dans le système cardiovasculaire où il semble diminuer la synthèse de triglycérides et il a un rôle très important dans le développement et le maintien des cellules du SNC (Bezard et al., 1994).

1.9.1.2 L'incorporation de DHA dans le cerveau

L'incorporation de DHA dans les cellules du cerveau et de la rétine contribue à la maturation fonctionnelle du SNC lors du développement périnatal (Innis, 2007). Par rapport aux autres PUFAs, le DHA est préférentiellement incorporé dans les membranes neuronales et y remplace l'acide arachidonique (AA), un PUFAs oméga-6 (Alessandri et al., 2004; Bezard et al., 1994). De ce fait, une diète riche en DHA augmente le ratio DHA/AA.

Les neurones ne peuvent pas synthétiser le DHA, n'ayant pas l'enzyme nécessaire. Les astrocytes, en contact étroit avec les neurones, semblent avoir un rôle important dans l'approvisionnement des neurones en DHA. Dans des conditions normales, le DHA existe dans les phospholipides sous sa forme estérifiée (Lagarde et al., 2001; Marszalek et al., 2005) tandis que dans des conditions pathologiques, la libération de DHA est induite par la phospholipase A2 (Kim, 2007).

1.9.1.3 La neuroprotection par le DHA

Les études épidémiologiques

Dans le cas de la MA, la relation entre une forte alimentation en poissons et en fruits de mer et une diminution de l'incidence de démence a été démontrée (Barberger-Gateau et al., 2002). Toutefois, les études épidémiologiques ont généré des données incohérentes quant à l'association entre les oméga-3 et le risque de développer la MP. Par exemple, l'étude Rotterdam, publiée en 2005, a mis en évidence une forte association entre une consommation riche en oméga-3 et une diminution du risque de développer la MP (de Lau et al., 2005), alors que d'autres études ont démontré une faible association entre une alimentation faible en oméga-3 et une augmentation du risque de développer la MP (Chen et al., 2003). La difficulté à quantifier la consommation exacte d'oméga-3 serait probablement la raison pour laquelle ces études ont des résultats contradictoires (Calon and Cole, 2007).

Les évidences expérimentales

Si les études épidémiologiques sont contradictoires quant à l'effet bénéfique des oméga-3 dans le cerveau, les études expérimentales sont tout autrement (Horrocks and Farooqui, 2004). Plusieurs études démontrent l'effet protecteur du DHA dans des modèles animaux de la MA (Calon and Cole, 2007) ou suite à un traumatisme neurologique tel qu'une blessure à la moelle épinière (King et al., 2006; Michael-Titus, 2007). En plus de protéger contre l'effet neurotoxique du MPTP dans des souris (Bousquet et al., 2008), l'administration de DHA diminue les dyskinésies induite par l'halopéridol et la L-dopa (Ethier et al., 2004; Samadi et al., 2006), ces études suggérant une forte relation entre les oméga-3 et la MP. D'autres études ont démontré qu'une déficience en DHA modifie la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique (Chalon, 2006), et que le DHA est nécessaire pour la différenciation neuronale (Kan et al., 2007). De plus, le pré-traitement au DHA protège de l'apoptose induite par la privation de sérum dans les cellules Neuro 2A (Akbar et al., 2006; Akbar et al., 2005; Kim et

al., 2000). L'administration de DHA pendant 24 heures protège les neurones en culture de la toxicité du peptide amyloïde β ($A\beta$) (Florent et al., 2006) et atténue l'apoptose induite par des agents apoptotiques comme la sphingosine et etoposide (Kishida et al., 1998; Wu et al., 2007). Récemment, il a été démontré que le DHA diminue l'effet neurotoxique du méthylmercure retrouvé dans le poisson (Kaur et al., 2008). Cette découverte est très intéressante sachant l'effet neurotoxique des contaminants marins tel que le mercure (Gochfeld and Burger, 2005). D'un autre côté, certaines études démontrent une augmentation de l'apoptose des cellules neuronales suite au traitement au DHA (Bate et al., 2008). Cet effet serait relié à l'augmentation de la peroxydation lipidique à des concentrations élevées de DHA (Cao et al., 2005; Leonardi et al., 2007).

1.9.1.4 Le mécanisme d'action du DHA

Le DHA en tant que composant membranaire

L'effet neuroprotecteur du DHA semble être relié à son incorporation dans les phospholipides et son action sur la fluidité membranaire. De plus, le DHA diminue la fragmentation de l'ADN, diminue l'activation de la caspase 3 et favorise la signalisation anti-apoptotique suite à la privation de sérum (Akbar et al., 2006; Akbar et al., 2005; Kim et al., 2000). Cet effet est dépendant de sa localisation dans les phosphatidylsérines puisque l'inhibition de l'accumulation de DHA dans les membranes abolit l'effet protecteur du DHA (Akbar et al., 2006). Par ailleurs, l'effet neuroprotecteur du DHA envers la toxicité du peptide $A\beta$ semble relié à son action bénéfique sur le cytosquelette, ce qui favoriserait l'inhibition de voies pro-apoptotiques et la préservation de voies anti-apoptotiques (Florent et al., 2006; Mirnikjoo et al., 2001).

Les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires du DHA

Les oméga-3 sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Arab et al., 2006). Par exemple, l'effet protecteur du DHA envers la toxicité du méthylmercure semble fortement relié à son pouvoir

antioxydant (Kaur et al., 2008). Tel qu'énoncé précédemment, une diète riche en DHA favorise un ratio DHA/AA élevée. De cette façon, le DHA prévient la conversion de l'AA en eicosanoïdes, des molécules pro-inflammatoires. Par ailleurs, le DHA semble diminuer l'activité de la phospholipase A2 qui est reconnue pour libérer les acides gras de la membrane lors de conditions pathologiques et favoriser l'inflammation (Martin, 1998). Récemment, des composés dérivés du DHA, les docosanoïdes, ont démontré un effet neuroprotecteur (Mukherjee et al., 2007). Par exemple, la neuroprotectine D1 semble avoir des propriétés très intéressantes dans les cellules photoréceptrices et les neurones (Bazan, 2005).

Le DHA en tant que ligand du RXR

Des données suggèrent que le DHA influencerait les fonctions neuronales par l'activation des voies de signalisation impliquant le RXR. En effet, il a été démontré que divers PUFAs se lient au RXR, et que le DHA se lie avec une plus grande affinité au LBD du RXR que le 9-cis-RA (de Urquiza et al., 2000; Lengqvist et al., 2004). Aussi l'effet anti-dyskinétique du DHA chez les souris traitées à l'halopéridol semble être relié à son action sur l'hétérodimère Nur77/RXR (Ethier et al., 2004).

1.9.2 L'estradiol

1.9.2.1 Généralités

Le 17 β -estradiol (E2) est l'hormone stéroïdienne sexuelle féminine la plus abondante et influence le développement, la croissance, la différenciation, la maturation et les fonctions de plusieurs tissus incluant le SNC (Behl, 2002; Pozzi et al., 2006). De plus en plus d'études confirment l'effet neuroprotecteur de l'E2 dans une multitude de pathologies impliquant le SNC (Manthey and Behl, 2006), et son mécanisme d'action est fortement étudié (Figure 1.25).

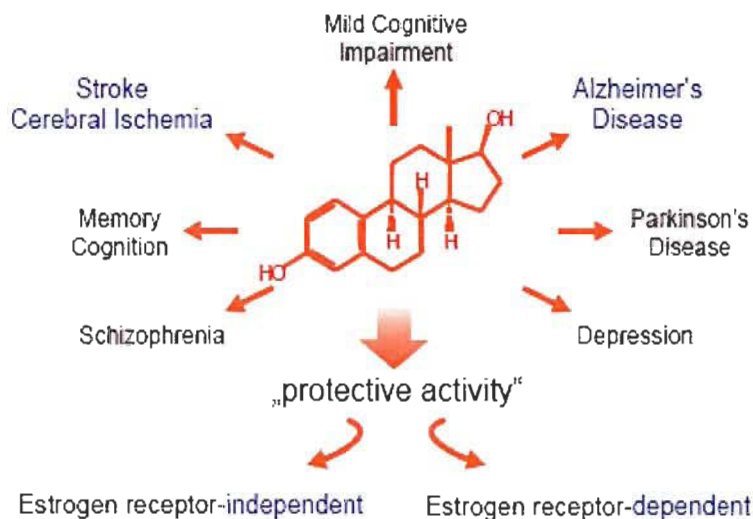


FIGURE 1.25 : Schéma de la structure et des actions de l'E2 dans le SNC. (Manthey and Behl, 2006)

1.9.2.2 La neuroprotection par l'E2

Les études épidémiologiques

L'hypothèse de l'effet neuroprotecteur de l'E2 découle du fait que les femmes sont moins à risque de développer la MP. En effet, l'incidence de la MP est plus élevée chez les hommes par rapport aux femmes (Figure 1.26). Après la période de 75 à 84 ans, l'incidence diminue chez les deux sexes puisqu'il y a une augmentation des décès (Shulman, 2007).

Les évidences expérimentales

Dans les études sur des modèles animaux avec des lésions cérébrales (ischémie et MP), la sévérité des lésions est souvent moindre dans les femelles par rapport aux mâles (Brann et al., 2007). Dans les modèles animaux de la MP, la plupart des études mettent en évidence une forte action neuroprotectrice de l'E2 (Liu and Dluzen, 2007; Morissette et al., 2008a). L'administration d'E2 a démontré un effet neuroprotecteur dans plusieurs systèmes *in vitro*. En effet, l'E2 protège les cellules neuronales d'un stress hypoxique ou ischémique (Jung et al., 2008) en plus d'atténuer l'apoptose induite par le peptide A β (Valles et al., 2008) ou par la privation de sérum (Gollapudi and Oblinger, 1999). De plus, des

travaux effectués dans notre laboratoire ont montré que l'E2 entraîne une diminution de la mortalité cellulaire induite par des toxines parkinsoniennes, soit le MPP+ et le paraquat, dans les cellules PC12 naïves ou différenciées (Gagne et al., 2003; Gelinas et al., 2004; Gelinas and Martinoli, 2002).

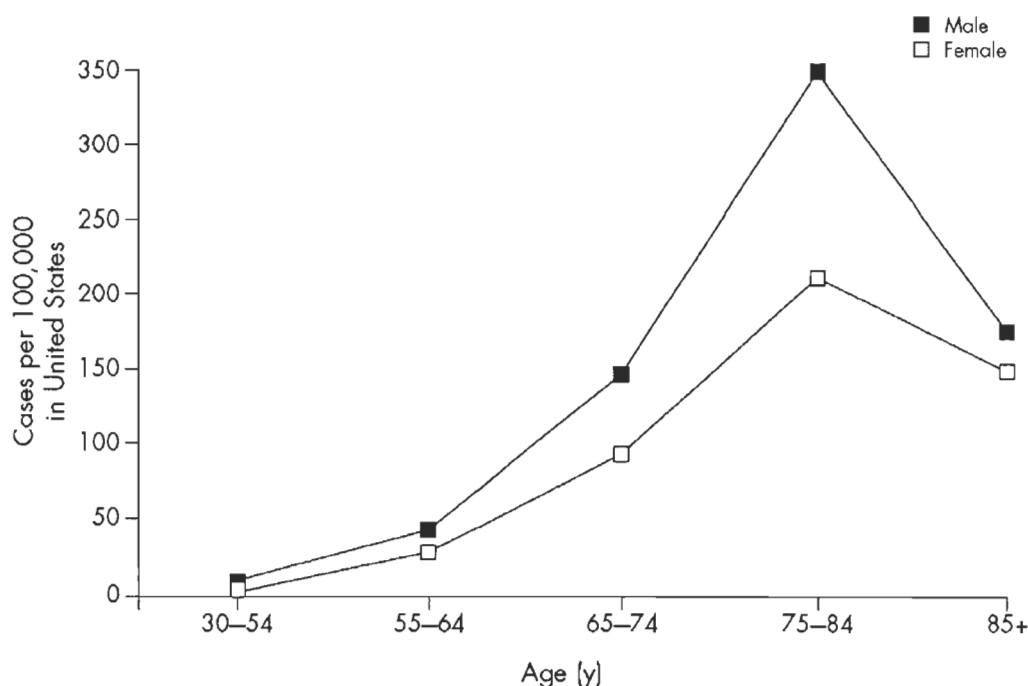


FIGURE 1.26 : Courbe de l'incidence de la MP chez les hommes et les femmes. (Shulman, 2007)

1.9.2.3 Le mécanisme d'action de l'E2

La voie classique génomique et la voie non-classique

L'E2 peut se lier à son récepteur, le récepteur estrogénique (ER), et agir selon la voie classique, génomique, et la voie non-classique (Figure 1.27). Le **mode d'action classique** implique la liaison de l'E2 au ER intracellulaire, la translocation nucléaire du complexe et la transcription de gènes. Il existe deux types d'ERs, le ER α et le ER β , et tous les deux sont exprimés à des endroits différents dans le cerveau. La liaison de l'E2 à son récepteur induit un changement conformationnel, la dimérisation des récepteurs, leur interaction

avec l'élément de réponse estrogénique et avec des co-activateurs (Morissette et al., 2008b). Puisque ces étapes s'étendent sur un certain temps, un pré-traitement de 24 heures est nécessaire pour étudier l'effet génomique de l'E2. De cette façon, l'E2 induit la transcription de trois types de gènes favorisant la survie neuronale. En effet, l'E2 favorise la transcription de gènes neurotrophiques, modifie l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose ainsi que des gènes qui codent pour des protéines structurales. L'action génomique de l'E2 ne peut pas expliquer à elle seule son effet neuroprotecteur.

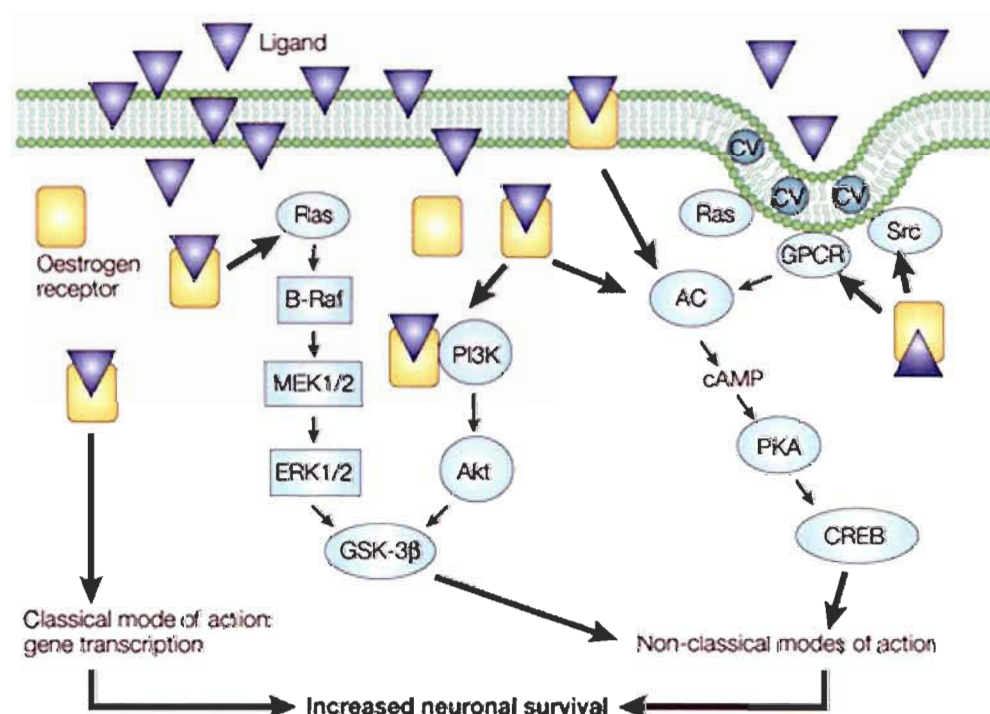


FIGURE 1.27 : Schéma du mode d'action classique et non-classique de l'E2. (Behl, 2002)

La **voie non-classique** est plus rapide puisqu'elle n'implique pas de transcription génique. Elle consiste plutôt en l'interaction de l'E2 avec des voies de signalisation intracellulaires, lié à son récepteur membranaire ou nucléaire (Behl, 2002). Les voies contrôlées par des kinases telles que les MAPK et PI3-k/Akt semblent intimement liées à l'action non-génomique de l'E2 (Dhandapani and Brann, 2007).

Le mécanisme antioxydant et anti-inflammatoire

De plus, l'E2 a un fort pouvoir antioxydant, et ce indépendamment de sa liaison à son récepteur. L'E2 prévient la production de ROS induite par la mitochondrie, de par son action sur la membrane ou en interagissant avec la GSH (Simpkins and Dykens, 2008). En plus de son effet direct sur les neurones, l'E2 pourrait avoir un effet neuroprotecteur par son action indirecte sur d'autres cellules du SNC (Dhandapani and Brann, 2007). En effet, l'E2 protège les cellules astrocytaires des dommages causés par un excès d'O₂ (hyperoxie) (Huppmann et al., 2008) et serait aussi efficace pour limiter l'activation de la microglie, phénomène retrouvé dans la MP (Liu and Dluzen, 2007).

Le lien entre l'E2, le RXR et Nur77

Il y a une dizaine d'année, une étude a identifié Nur77 comme IEG lors de la stimulation mitogénique de cellules utérines de rat par l'E2 (Cicatiello et al., 1993). De plus, il semblerait que l'E2 induit l'expression du RXR dans des cellules épithéliales cervicales (Celli et al., 1996). Par ailleurs, il a été démontré que Nur77 peut s'hétérodimériser avec le récepteur associé au ER (ERR) (Lammi et al., 2007). Le ERR est un récepteur orphelin et ne lie pas l'E2, mais cette évidence suggère une interaction directe entre Nur77 et les ERs. Ces études permettent de faire un lien entre l'E2, le RXR et Nur77 et rendent cette molécule encore plus intéressante dans le cadre de mon projet de maîtrise.

1.9.2.4 Les effets secondaires de la thérapie estrogénique

L'utilisation d'estrogène chez les femmes post-ménopausées entraîne plusieurs bienfaits au niveau de la neuroprotection, mais des risques importants y sont aussi associés. En effet, la prise d'estrogène de façon prolongée augmente le risque de développer des cancers hormono-dépendants (ASRM, 2008). La thérapie préventive par l'estrogène étant controversée, de nouvelles approches

préventives comme l'utilisation de phytoestrogènes sont intéressantes (Fitzpatrick, 1999).

1.9.3 Le resvératrol

1.9.3.1 Généralités

Le resvératrol (Resv) est un polyphénol de la structure d'un stilbène (deux noyaux phénoliques regroupés par un groupement éthène) retrouvé dans des petits fruits (mûres, framboises), des noix, dans plus de 70 espèces de plantes et dans la pelure des raisins rouges (vin rouge). Le Resv existe sous forme de deux isomères, soit le *trans*- et le *cis*-Resv, ce dernier étant instable et peu retrouvé. Le Resv a été initialement reconnu pour ses propriétés en tant qu'agent cardioprotecteur, une conséquence de son action inhibitrice sur l'agrégation plaquettaire et l'oxydation du cholestérol. De nos jours, il est reconnu que le *trans*-Resv (Figure 1.28) possède plusieurs propriétés pharmacologiques au niveau du SNC et celles-ci seront abordées dans cette partie du mémoire (Pirola and Frojdo, 2008).

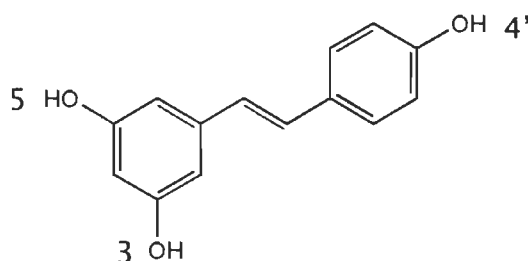


FIGURE 1.28 : Structure chimique du Resv. (Pirola and Frojdo, 2008)

1.9.3.2 La neuroprotection par le Resv

À ce jour, le Resv a été identifié comme un agent neuroprotecteur dans les modèles animaux de la MA, de la MP, de la maladie d'Huntington et lors de dommages ischémiques (Anekonda, 2006; Rocha-Gonzalez et al., 2008). Dans

les souris traitées au MPTP, le Resv restreint la perte neuronale dans la SNpc (Blanchet et al., 2008) et diminue la perte de motricité (Lu et al., 2008). L'effet neuroprotecteur du Resv est aussi observé dans les rats traités à la 6-OHDA (Jin et al., 2008). Dans les cellules en culture, le Resv protège de l'apoptose neuronale induite par un excès de DA (Lee et al., 2007) et de la rotenone (Aquilano et al., 2008). Nous avons aussi récemment démontré que le Resv protège les neurones de la neuro-inflammation induite par l'activation de la microglie (Bureau et al., 2008).

1.9.3.3 Le mécanisme d'action du Resv

Mécanisme estrogénique

La similarité structurale entre le Resv et l'E2 suggère que cette molécule possède une activité estrogénique par sa liaison au ER et cette molécule est donc classée comme phytoestrogène (Gehm et al., 1997). Par contre, le Resv aurait une activité en tant qu'agoniste ou antagoniste des ERs, dépendamment de sa concentration, du type cellulaire et du ER impliqué (Basly et al., 2000; Bowers et al., 2000).

Mécanisme antioxydant et anti-inflammatoire

À faible concentration, le Resv est reconnu pour être une molécule antioxydante qui diminue la production de ROS par son action sur plusieurs voies de signalisation et d'enzymes (Figure 1.29). En effet, le Resv diminue la production de ROS induite par le MPTP et la 6-OHDA (Lu et al., 2008) en augmentant l'activité d'enzymes antioxydantes tel que la SOD, la Cat et la GPX (Aquilano et al., 2008). De plus, l'atome hydrogène du groupement OH du noyau phénolique peut facilement être absorbé par des radicaux peroxy toxiques pour former un produit non-réactif et contrecarrer le stress oxydant (Amorati et al., 2003). Le Resv module l'activité de protéines pro-inflammatoires (COX, NF- κ B) et d'autres voies de signalisation qui produisent des précurseurs de l'inflammation. De

cellules de neuroblastomes, de cellules cancéreuses du colon, et de cellules cancéreuses du sein (Udenigwe et al., 2008). Cet effet est intimement lié à sa concentration, puisqu'une concentration faible de Resv peut avoir un effet inverse. Lorsqu'il est présent en forte concentration, le Resv peut induire la production de ROS et induire l'apoptose. Le Resv interagit avec plusieurs cibles cellulaires tels que des protéines anti- et pro-apoptotiques (Filomeni et al., 2007). La figure 1.30 résume la séquence d'événements induite par le Resv dans des cellules cancéreuses.

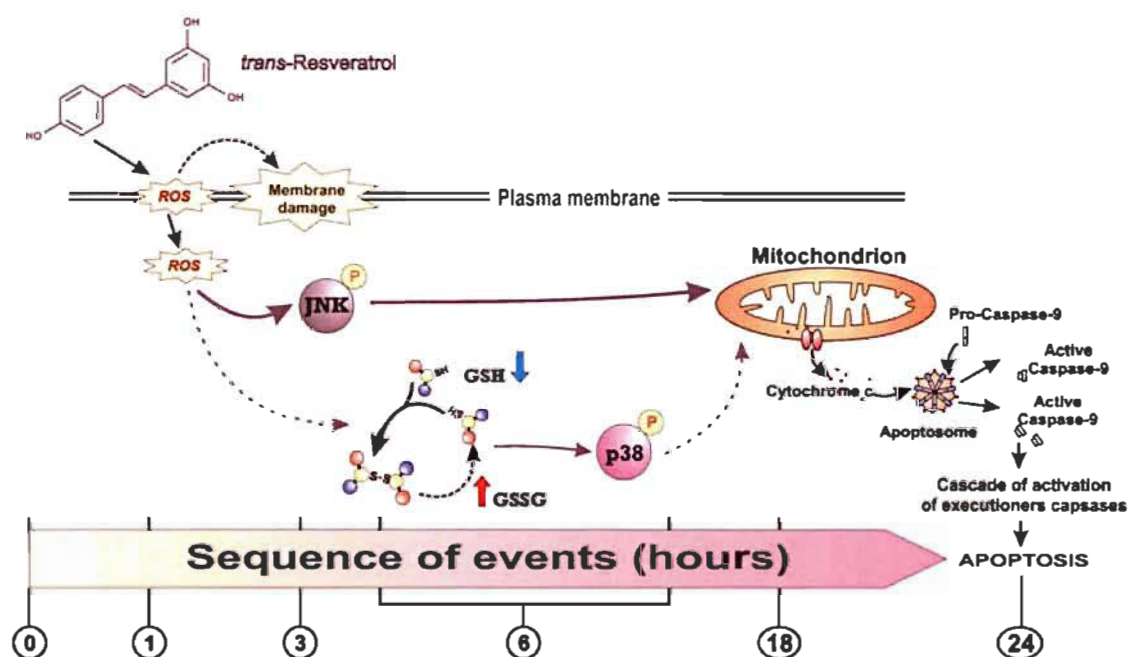


FIGURE 1.30 : Schéma de l'initiation de l'apoptose par le Resv dans des cellules cancéreuses. (Filomeni et al., 2007)

1.10 Les objectifs du mémoire

Le **premier objectif** de mes travaux de maîtrise était de déterminer l'effet protecteur d'un ligand du RXR, le DHA envers la toxicité du MPP⁺ et de la 6-OHDA. Ensuite, nous avons examiné l'effet du MPP⁺, de la 6-OHDA et du pré-traitement au DHA sur la translocation de Nur77. Ces résultats seront inclus dans un article en collaboration avec le Dr Claude Rouillard de l'Université Laval.

Puisque le laboratoire de Neurobiologie Cellulaire de Dre Martinoli s'intéresse particulièrement à l'effet protecteur de molécules estrogéniques dans le cadre de la MP, mon **second objectif** était de vérifier l'effet protecteur de l'E2 et du Resv sur la toxicité induite par la 6-OHDA. Nous avons aussi déterminé l'effet de ces substances sur la localisation cellulaire de Nur77. Enfin, nous avons vérifié la possible liaison de l'E2 et du Resv à l'hétérodimère RXR/Nur77. Pour ce faire, nous avons utilisé deux méthodes, soit l'immunoprécipitation des complexes nucléaires et l'ajout d'un antagoniste du RXR. Ce deuxième objectif fera l'objet d'une publication qui sera soumise sous peu.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture des cellules PC12

Les cellules PC12 sont des cellules qui ont été isolées de phéochromocytomes de rat qui ont la propriété de synthétiser de grandes quantités de cathécolamines, dont la DA, la noradrénaline et la sérotonine. Suite à l'ajout de NGF dans le milieu, les cellules cessent de se diviser et arborent des prolongements cytoplasmiques : elles se différencient en un phénotype exclusivement dopaminergique (Greene and Tischler, 1976). Cette lignée cellulaire est une des plus utilisées pour l'étude des mécanismes neurodégénératifs dans la MP (Walkinshaw and Waters, 1994). Les présents travaux ont été effectués avec des cellules PC12 non-différenciées, c'est-à-dire naïves (Figure 2.01).

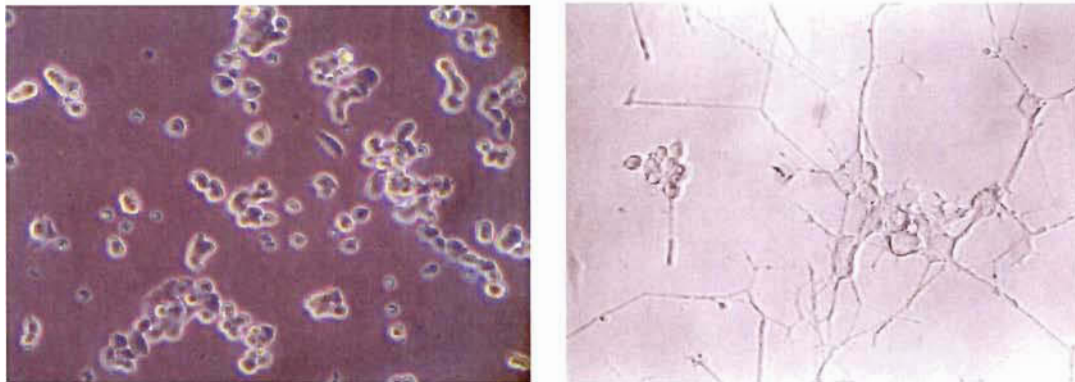


FIGURE 2.01 : Représentation des cellules PC12. À gauche, les PC12 naïves et à droite, les PC12 différenciées.

La croissance des cellules PC12 (ATCC) a été effectuée dans un environnement humidifié à 37 °C contenant 5 % de CO₂ dans un milieu RPMI 1640 stock sans rouge phénol contenant 10 % de sérum de cheval et 5 % de sérum bovin foetal. Le milieu a été renouvelé tous les trois jours et les cellules étaient confluentes après 7 jours pour une densité cellulaire initiale de 45 000 cellules par cm². Les flacons et les plaques utilisés pour la culture cellulaire ont

été enduits de collagène 0,01 % toute une nuit à 4 °C. Une période d'attente de 24 heures a été respectée avant chaque traitement afin que les cellules adhèrent.

2.2 Potentiel protecteur du DHA envers la toxicité du MPP⁺ et de la 6-OHDA

Préparation de la solution mère de DHA : Le DHA (Sigma) a été dissout dans de l'éthanol dégazéifié à une concentration de 1 mM. Des aliquotes de la solution mère ont été préparées dans une atmosphère d'azote afin d'éviter l'oxydation du produit et elles ont été conservées dans le noir à -20 °C (Mirnikjoo et al., 2001).

Traitements : Les cellules ont été cultivées et traitées dans une plaque de 96 puits tel que présenté à la figure 2.02. Un pré-traitement de 3 heures a été effectué avec une solution fraîche de DHA d'une concentration de 1 μ M. La concentration finale en éthanol était de 0,1 % pour éviter l'effet toxique du solvant. Les cellules ont été traitées avec le MPP⁺ 5 mM (Gagne et al., 2003; Gelinas et al., 2004; Gelinas and Martinoli, 2002) (Sigma) ou la 6-OHDA 30 μ M (Sigma) pendant 24 heures. Un traitement avec le DHA seul a été fait afin de vérifier son innocuité.

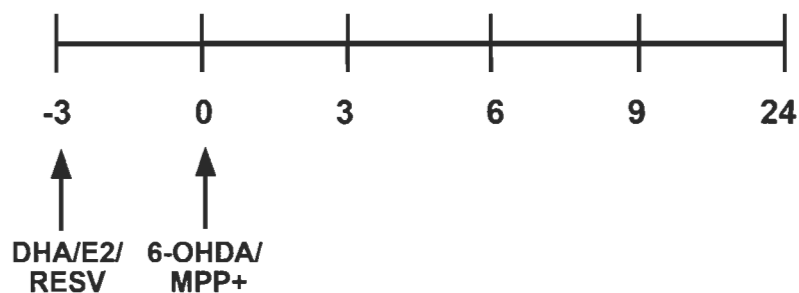


FIGURE 2.02 : Schéma de la cinétique des traitements.

Test de cytotoxicité : Le potentiel neuroprotecteur du DHA a été évalué par une technique colorimétrique qui permet la quantification de la mort cellulaire par la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH). La LDH est une enzyme cytoplasmique stable rapidement libérée dans le surnageant par les cellules endommagées. L'activité de cette enzyme est mesurée par un test enzymatique de deux étapes représenté à la figure 2.03. Tout d'abord, le NAD^+ est réduit en NADH/H^+ par la conversion de l'acide lactique en acide pyruvique par la LDH. La seconde étape consiste en la conversion du sel de tétrazolium (jaune) en sel de formazan (rouge). L'augmentation de l'activité de la LDH est proportionnelle à la quantité de formazan formé. Après la période de traitement, 100 μL du surnageant a été prélevé et déposé dans une plaque de 96 puits non-stérile. Ensuite, 100 μL du mélange réactif a été ajouté dans chaque puits et la plaque a été incubée dans le noir à la température de la pièce pendant 5 minutes. La densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 492 nm avec un lecteur de microplaques de type Multiscan Ascent Microplate Reader (Thermolab System).

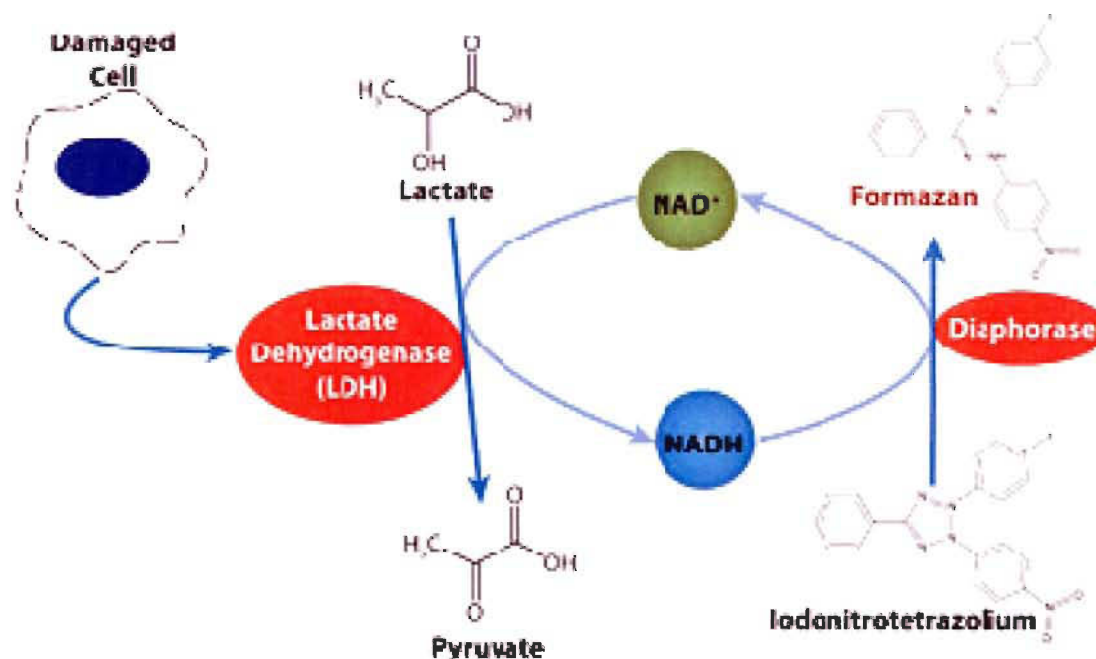


FIGURE 2.03 : Schéma des réactions enzymatiques impliquées dans le test de cytotoxicité LDH.

La quantité maximale (100%) de cellules mortes a été déterminée en ajoutant du Triton-X 0,1 % au milieu de traitement (Abs_{max}) et le milieu de traitement seul a été utilisé pour la mortalité de base (Abs_{base}). Le pourcentage de cytotoxicité a été calculé à l'aide de l'équation 2.1.

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{(Abs_{exp} - Abs_{base})}{(Abs_{max} - Abs_{base})} \times 100$$

Formule pour le calcul de la cytotoxicité

[2.1]

2.3 Effet du traitement au MPP+ ou à la 6-OHDA et du pré-traitement au DHA sur la localisation cellulaire de Nur77

A- Par immunofluorescence

Traitements : Les cellules PC12 ont été cultivées sur des lamelles de verre dans une plaque de 24 puits et ont été traitées soit au MPP+ 5 mM ou à la 6-OHDA 30 μ M pendant 9 heures.

Immunofluorescence : Nous avons déterminé la localisation de Nur77 par immunofluorescence par le marquage spécifique de Nur77 et des noyaux. Après le traitement des cellules, le milieu a été retiré et les cellules ont été fixées avec de la paraformaldéhyde 4 % pendant 1 heure à 4 °C pour conserver les structures cellulaires. Ensuite, les cellules ont été perméabilisées et les sites non-spécifiques bloqués par une solution de tampon de gélatine de peau de poisson et de Triton-X 1 % pendant 30 minutes à la température de la pièce. Les lamelles ont ensuite été incubées avec l'anticorps polyclonal anti-Nur77 (Santa Cruz Biotechnologie) toute une nuit à 4 °C, puis avec un anticorps secondaire lié au fluorochrome Cy3 (Sigma) pendant une heure à la température de la pièce. L'ajout de 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) a permis le marquage des noyaux. Les lamelles ont été montées sur des lames de microscopes avec la solution de montage Prolong Antifade Kit

(Invitrogen). Après 24 heures de séchage, les lamelles ont été visualisées avec un microscope à fluorescence inversé de type Leitz Orthoplan.

B- Par immunobuvardage de type Western

Traitement : Les cellules PC12 ont été cultivées dans des plaques de 6 puits et ont été traitées soit au MPP+ 5 mM ou à la 6-OHDA 30 μ M pendant 0, 6, 9 et 24 heures avec ou sans pré-traitement de 3 heures au DHA. Pour chaque temps de traitement, une condition contrôle a été effectuée avec le milieu de traitement.

Extraction des protéines avec le «Nuclear Extract Kit» : Les protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été extraites avec une trousse d'extraction spécifique (Nuclear extract kit, Active Motif) selon le protocole suivant. Les cellules ont été décollées avec le milieu puis transférées dans des tubes 1,5 mL. Les tubes ont été centrifugés pendant 5 min et le surnageant a été enlevé. Le culot de cellules a été resuspendu dans 500 μ L d'un mélange de tampon phosphate salin (PBS) et d'inhibiteurs des phosphatases pour limiter les modifications protéiques. Après une centrifugation de 5 min, le culot de cellules a été resuspendu dans 50 μ L de tampon hypotonique et les tubes ont été incubés 15 min sur la glace pour fragiliser les membranes. L'ajout de 25 μ L de détergent a permis la libération des protéines dans le surnageant qui a été recueilli (fraction cytoplasmique). Les culots ont été lavés avec 200 μ L du mélange de PBS et d'inhibiteurs des phosphatases pour éliminer les traces de protéines cytoplasmiques. Les culots de noyaux ont été resuspendus dans 50 μ L de tampon de lyse complet (dithiothreitol, tampon de lyse AM1, cocktail d'inhibiteurs de protéases) et les tubes ont été incubés pendant 30 minutes sur la plaque agitatrice afin de solubiliser les protéines nucléaires. Après centrifugation des tubes, les surnageants contenant la fraction nucléaire ont été recueillis.

Dosage des protéines : La concentration de protéines des échantillons a été déterminée par une technique colorimétrique avec l'acide bicinchoninique (BCA Protein Assay Kit).

Immunobuvardages de type Western : Les protéines ont été diluées dans un tampon d'échantillon (β -mercaptoéthanol, sodium dodecyl sulfate (SDS), Tris-HCl, glycérol, bleu de bromophénol) et chauffées à 95 °C pendant 5 minutes pour la dénaturation. L'électrophorèse des protéines cytoplasmiques et nucléaires a été effectuée sur un gel de polyacrylamide 10 % à 180 V pendant 45 minutes à 4 °C. La quantité de protéines à charger dans les puits a été la même pour chaque condition (25 μ g).

Après avoir été séparées, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoré (PVDF, pores de dimension 0,2 μ m, Bio-Rad) à 60 V pendant 2 heures à 4 °C. Les membranes ont été bloquées dans une solution de lait en poudre non gras (LPNG) 5 % pendant une heure. Les anticorps primaires et secondaires ont été dilués dans une solution de LPNG 1 %. Les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-Nur77 dilué 1:500 à la température de la pièce pendant toute la nuit, puis pendant une heure à la température de la pièce avec l'anticorps secondaire anti-lapin dilué 1:10 000.

Afin de confirmer la séparation des protéines, les membranes ont été décapées avec la solution Re-Blot Plus Strong et incubées avec les anticorps anti-TH (Sigma) et anti-histone déacétylase (HDAC1, Santa Cruz Biotechnology) pour les protéines cytoplasmiques et nucléaires respectivement.

Les bandes de protéines ont été révélées à l'aide d'une méthode de chimiluminescence (68 mM d'acide p-Coumarique dans DMSO; 1,25 mM de Luminol dans Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 et H₂O₂ 30%) (Haan and Behrmann, 2007), et les images ont été acquises avec l'appareil Fluor Chem (Alpha Innotech). L'analyse de l'intensité des bandes a été effectuée avec le logiciel ImageJ.

2.4 Potentiel protecteur de l'E2 et du Resv envers la toxicité de la 6-OHDA

Préparation de la solution mère de β -E2 et de Resv : L'E2 (Sigma) et le Resv (Sigma) ont été dissouts dans de l'éthanol à une concentration de 1 mM. Les solutions stocks ont été conservées dans le noir à -20 °C.

Traitements : Les cellules ont été cultivées et traitées dans une plaque de 96 puits. Un pré-traitement de 3 heures a été effectué avec une solution fraîche d'E2 ou de Resv d'une concentration de 10^{-7} M. Ensuite, les cellules ont été traitées avec une solution de 6-OHDA 30 μ M pendant 24 heures. Un traitement avec l'E2 ou le Resv seul a été fait afin de vérifier leur innocuité.

Test de cytotoxicité : Idem au point 2.2.

Mesure de la fragmentation de l'ADN : Nous avons déterminé l'effet de l'E2 et du Resv sur l'apoptose induite par le 6-OHDA à l'aide d'une trousse ELISA qui dose les fragments d'ADN (ssDNA Apoptosis ELISA kit, Chemicon). Cette trousse permet une détection de l'ADN simple brin (ADNss) spécifique à l'apoptose. Après les traitements, la plaque a été centrifugée à 300 g pendant 5 minutes, puis le milieu a été enlevé. Après la fixation des cellules avec une solution de méthanol 80 % dans du PBS, la formamide a été ajoutée dans les puits et a dénaturé de façon spécifique l'ADN des cellules apoptotiques. Ensuite, un mélange d'anticorps primaires et secondaires conjugués à la peroxydase a été ajouté. Enfin, la solution de 2,2'-azino-bis (3-éthylbenziazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) a formé une réaction colorimétrique mesurée par le lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 405 nm. (Équation 2.2). Un contrôle négatif a été créé par l'ajout de S1 Nucléase (Invitrogen), une enzyme qui permet l'hydrolyse de l'ADNss, et un contrôle positif était fournit dans la trousse.



Réaction catalysée par la peroxydase en présence d'ABTS [2.2]

2.5 Effet du traitement au 6-OHDA et du pré-traitement à l'E2 et au Resv sur la localisation cellulaire de Nur77

Traitements : Les cellules PC12 ont été cultivées dans des plaques de 6 puits et ont été traitées avec la 6-OHDA 30 μM pendant 0, 6, 9 et 24 heures avec ou sans pré-traitement de 3 heures à l'E2 ou au Resv. Pour chaque temps de traitement, une condition contrôle a été effectuée avec le milieu de traitement.

Extraction des protéines avec le Nuclear Extract Kit : Idem au point 2.3.

Dosage des protéines : Idem au point 2.3.

Immunobuvardages de type Western : Idem au point 2.3.

2.6 Vérification de l'interaction entre le DHA, l'E2 et le Resv avec l'hétérodimère RXR/Nur77

A- Par co-immunoprécipitation des complexes nucléaires

Traitements : Les cellules ont été traitées pendant 3 heures avec le DHA, l'E2 et le Resv aux mêmes concentrations qu'utilisées précédemment.

Extraction des complexes nucléaires : L'extraction des complexes nucléaires a été effectuée avec une trousse commerciale d'Active Motif, le «Nuclear Complex Co-IP Kit» qui permet l'isolation d'un complexe particulier par son immunoprécipitation. Tout d'abord, les cellules sont décollées et resuspendues dans un mélange de PBS et d'inhibiteurs des phosphatases. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans un tampon hypotonique pour fragiliser les

membranes. L'addition de détergent a permis la rupture des membranes et la libération des protéines cytoplasmiques dans le surnageant. La fraction cytoplasmique a été jetée, et les noyaux ont été lysés dans un tampon de basse salinité en présence d'un cocktail d'inhibiteurs des protéases et de phénylméthane sulphonyl fluoride pour protéger les complexes. L'ajout d'un cocktail de découpage enzymatique a permis la digestion de l'ADN et la libération des complexes y étant lié. Les complexes nucléaires ont ensuite été récoltés pour effectuer l'immunoprécipitation.

Immunoprécipitation des complexes : Une quantité égale de protéines (100 µg) a été ajoutée à un tampon de basse stringence fourni dans le kit pour l'immunoprécipitation. À chacune des conditions, 5 µg d'anti-Nur77 a été ajouté, sauf pour une condition de contrôle négatif. L'anticorps a été incubé avec les complexes toute une nuit sur une plaque rotatrice à la température de la pièce. Ensuite, des billes d'agarose de type A/G (Santa Cruz Biotechnology) ont été ajoutées pour immunoprécipiter les anticorps liés aux complexes.

Immunobuvardages de type Western : Le culot de billes d'agarose liées aux anticorps a été resuspendu dans le même tampon d'échantillon qu'au point 2.3 et chauffées à 95 °C pendant 5 minutes. Les tubes ont été centrifugés, et le surnageant a été déposé dans les puits d'un gel d'acrylamide 8 %. Les étapes d'immunobuvardage ont été les mêmes que présentées au point 2.3. Après le transfert des protéines, les membranes ont été incubées avec l'anticorps anti-RXR (Santa Cruz Biotechnology) dilué 1 :250 pendant toute une nuit à la température de la pièce.

B- Par l'ajout d'un antagoniste du RXR

Traitements : Une solution stock de l'antagoniste du RXR, le HX531 (Figure 2.04) fourni par le Dr Daniel Lévesque, a été effectuée dans de l'éthanol à une concentration finale de 2 mM. Les cellules ont été traitées avec le HX531 à la

même concentration que le DHA (1 μ M) en même temps que le pré-traitement au DHA pour vérifier son effet sur la cytotoxicité induite par la 6-OHDA.

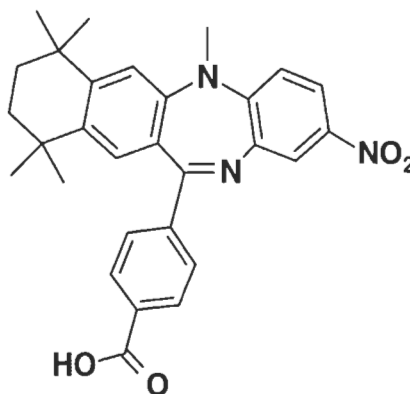


FIGURE 2.04 : Structure chimique du HX531. (Sakaki et al., 2007)

Test de cytotoxicité : Idem au point 2.2.

2.7 Analyses statistiques des données

Le traitement statistique des données a été effectué avec le logiciel GraphPadInStat3, avec un test ANOVA suivi d'un post test Bonferroni. Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne d'au moins trois expériences, et celles-ci sont différentes du contrôle ou de la condition avec le MPP+ ou la 6-OHDA lorsqu'elles sont accompagnées d'une étoile (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$) ou d'un cercle ($^{\circ}$ $P < 0,05$; $^{\circ\circ}$ $P < 0,01$; $^{\circ\circ\circ}$ $P < 0,001$) respectivement.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Potentiel protecteur du DHA sur la toxicité induite par le MPP+ et la 6-OHDA

Par la mesure de l'activité de la LDH, nos résultats montrent que l'administration de MPP+ 5 mM entraîne un pourcentage de cytotoxicité d'environ 50 % après 24 heures de traitement (Figure 3.01).

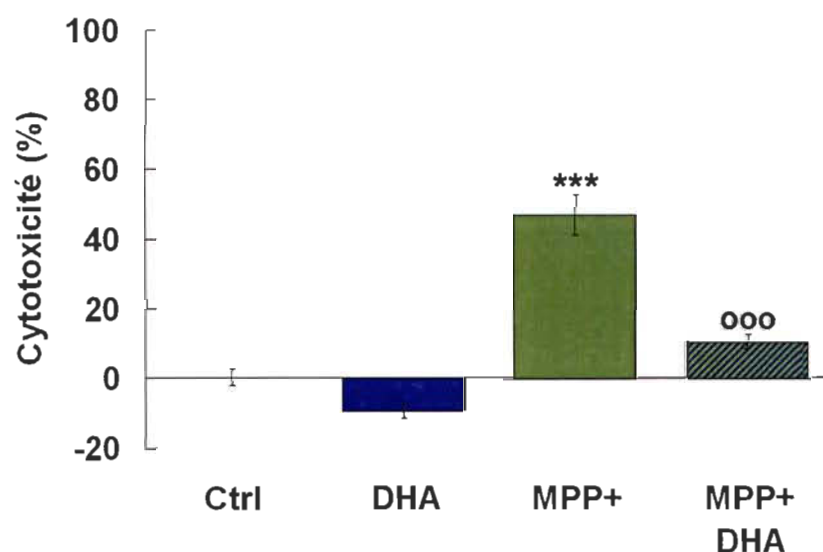


FIGURE 3.01: Mesure de la mortalité cellulaire par la technique LDH suite au pré-traitement au DHA et au traitement au MPP+.

Ce pourcentage est en accord avec les valeurs de cytotoxicité obtenues chez les cellules PC12 dans des études précédemment effectuées dans notre laboratoire (Gagne et al., 2003; Gelinas and Martinoli, 2002). Alors que le DHA à une concentration de 1 μ M administré seul n'entraîne pas de mortalité, son administration 3 heures avant l'ajout de MPP+ diminue significativement la toxicité du MPP+ à une valeur équivalente à celle du contrôle. Le temps de traitement a été choisi selon des études qui ont démontré l'accumulation de

DHA dans les membranes des PC12 après 2 heures de traitement (Ikemoto et al., 1999; Richardson and Wurtman, 2007), et la concentration de 1 μ M suite à une dose réponse (résultats non-montrés).

Par la suite, nous avons déterminé le potentiel protecteur du DHA envers la toxicité de la 6-OHDA. Nos résultats à la figure 3.02 montrent que la 6-OHDA à une concentration de 30 μ M entraîne un pourcentage de cytotoxicité d'environ 60 %, ce qui est comparable à la valeur obtenue avec le traitement au MPP+. Le pré-traitement au DHA diminue significativement le pourcentage de cytotoxicité à 40 %.

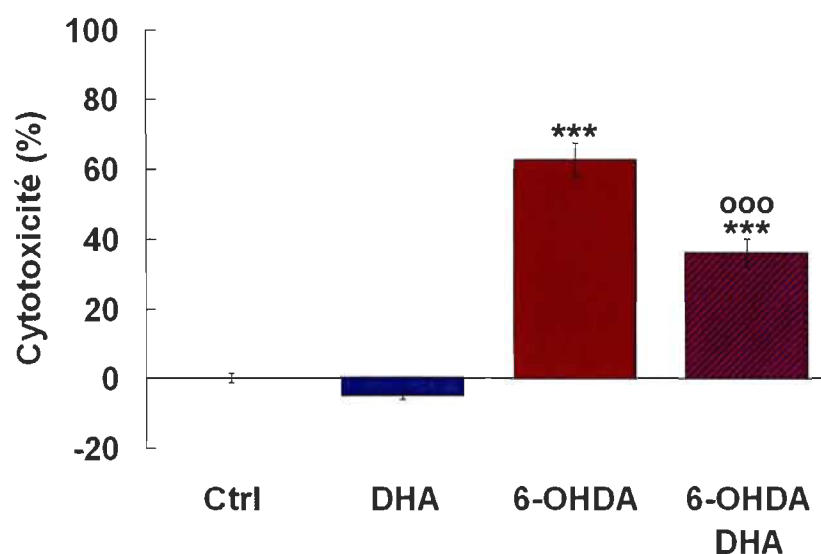


FIGURE 3.02 : Mesure de la mortalité cellulaire par la technique LDH suite au pré-traitement au DHA et au traitement à la 6-OHDA.

3.2 Modulation de l'expression de Nur77 dans le cytoplasme et le noyau suite au traitement au MPP+ et à la 6-OHDA

Tout d'abord, nous avons vérifié l'effet du MPP+ et de la 6-OHDA sur la localisation de Nur77 par immunofluorescence avec un anticorps spécifique dirigé contre Nur77. Nous avons choisi d'effectuer un traitement de 9 heures suite à des résultats obtenus par PCR qui montrent une augmentation des

marqueurs apoptotiques à ce temps de traitement (résultats obtenus dans notre laboratoire par K. Chiasson, mais non montrés dans ce mémoire).

Tel que présenté à la figure 3.03, il y a une forte colocalisation entre le marquage de Nur77 et du DAPI dans la condition contrôle, alors que le marquage de Nur77 dans le cytoplasme est faible. Par contre, le traitement au MPP+ et à la 6-OHDA pendant 9 heures favorise le marquage de Nur77 dans le cytoplasme.

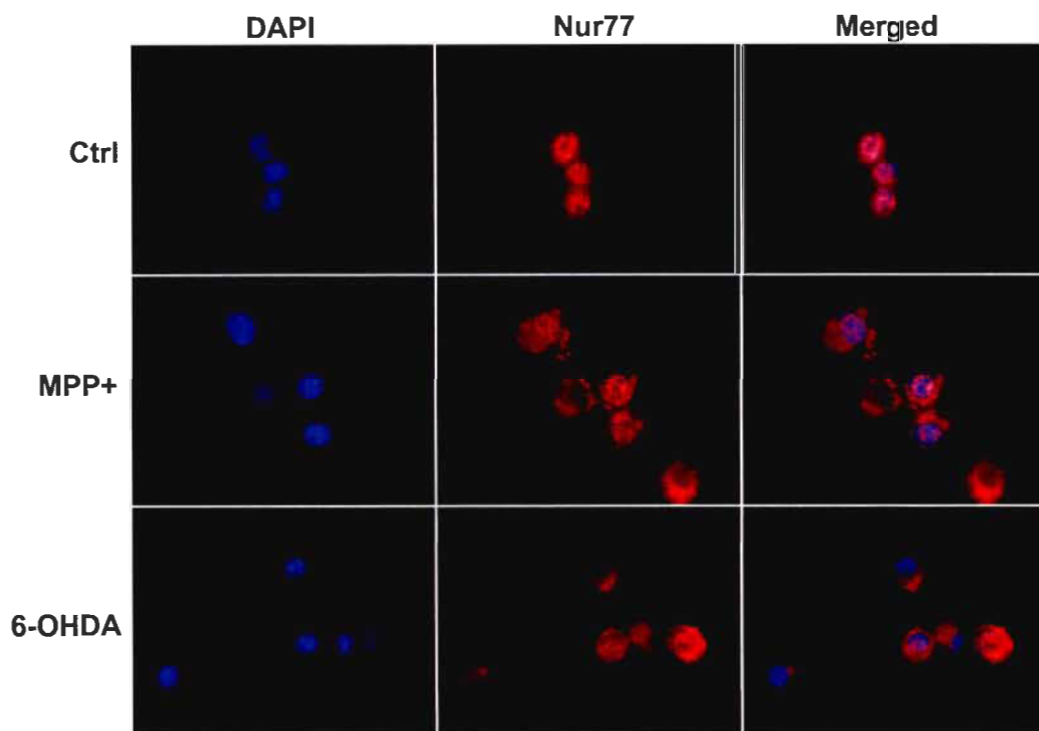


FIGURE 3.03 : Évaluation de la localisation de Nur77 par immunofluorescence suite au traitement de 9 heures au MPP+ et à la 6-OHDA.

Par la suite, nous avons déterminé l'effet du MPP+ et de la 6-OHDA sur la translocation de Nur77 par immunobuvardage de type Western des fractions de protéines cytoplasmiques et nucléaires. Pour ce faire, des traitements de 0, 6, 9 et 24 heures ont été effectués pour avoir une vision plus complète de la translocation de Nur77 par rapport au temps.

Nos résultats d'immunobuvardages sont exprimés en pourcentage de contrôle par rapport à un contrôle différent pour chaque temps de traitement et les valeurs sont comparées à la valeur au temps 0 pour chaque condition. La valeur de l'expression totale de Nur77 n'est pas montrée puisqu'elle varie peu entre les traitements. Un ratio cytoplasmique/nucléaire de l'expression de Nur77 a été calculé afin d'avoir une vision de la localisation de Nur77 pour chaque temps. Nos résultats avec le MPP+ montrent une diminution de l'expression de Nur77 dans la fraction nucléaire à 9 heures de traitement par rapport au temps 0 et la valeur de Nur77 correspondant à 85 % par rapport à celle du contrôle (Figure 3.04). Nos résultats tendent à montrer une augmentation de Nur77 dans la fraction cytoplasmique (132 %) après 9 heures de traitement, bien que la différence ne soit pas significative. Après 24 heures de traitement, l'expression de Nur77 est augmentée dans la fraction nucléaire. Aussi, le traitement au MPP+ double le ratio cyt/nuc après 9 heures de traitement.

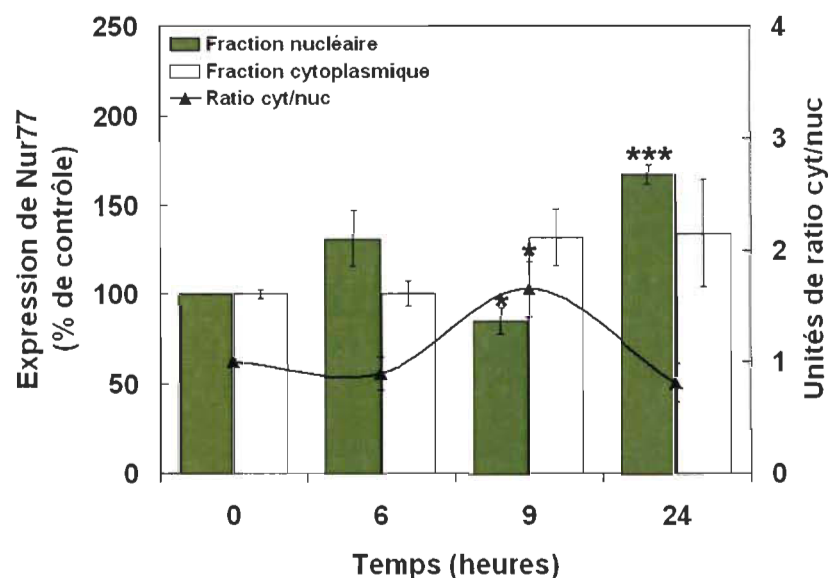


FIGURE 3.04 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement au MPP+.

La figure 3.05 montre qu'un traitement de 9 heures à la 6-OHDA diminue l'expression de Nur77 dans la fraction nucléaire (50 %) et augmente l'expression de Nur77 dans le cytoplasme (147 %), alors qu'il n'y a aucune modulation aux autres temps de traitement. Par ailleurs, le traitement à la 6-

OHDA provoque une augmentation du ratio cyt/nuc de 3 fois la valeur au temps 0 après 9 heures de traitement.

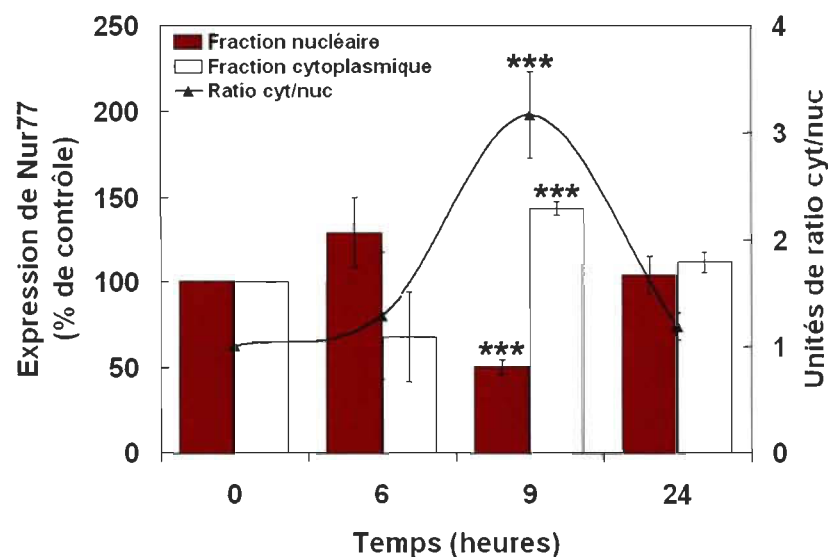


FIGURE 3.05 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement à la 6-OHDA.

3.3 Modulation de l'expression de Nur77 dans le cytoplasme et le noyau suite à un pré-traitement au DHA

La figure 3.06 montre que le traitement des cellules PC12 avec le DHA augmente significativement l'expression de Nur77 dans la fraction nucléaire après 6 heures et 24 heures de traitement, alors que son expression dans la fraction cytoplasmique ne semble pas être modifiée. Aussi, le traitement au DHA ne modifie pas la valeur du ratio cyt/nuc de Nur77 par rapport au temps.

Sachant que le DHA tend à augmenter l'expression de Nur77 dans le noyau des cellules, nous avons extrait les protéines suite à un pré-traitement au DHA et à un traitement au MPP+ (Figure 3.07) ou à la 6-OHDA (Figure 3.08). Nos résultats montrent que le DHA en traitement avant l'ajout de MPP+ entraîne une augmentation de l'expression de Nur77 dans la fraction nucléaire après 6, 9 et 24 heures alors que son expression dans la fraction cytoplasmique ne semble pas être modifiée (Figure 3.07). Le pré-traitement au DHA augmente

l'expression de Nur77 dans le noyau à 9 heures de traitement par rapport au traitement au MPP+ seul. De plus, le pré-traitement au DHA diminue le ratio cyt/nuc après 24 heures de traitement et diminue significativement le ratio cyt/nuc à 9 heures par rapport au ratio obtenu avec le MPP+ seulement.

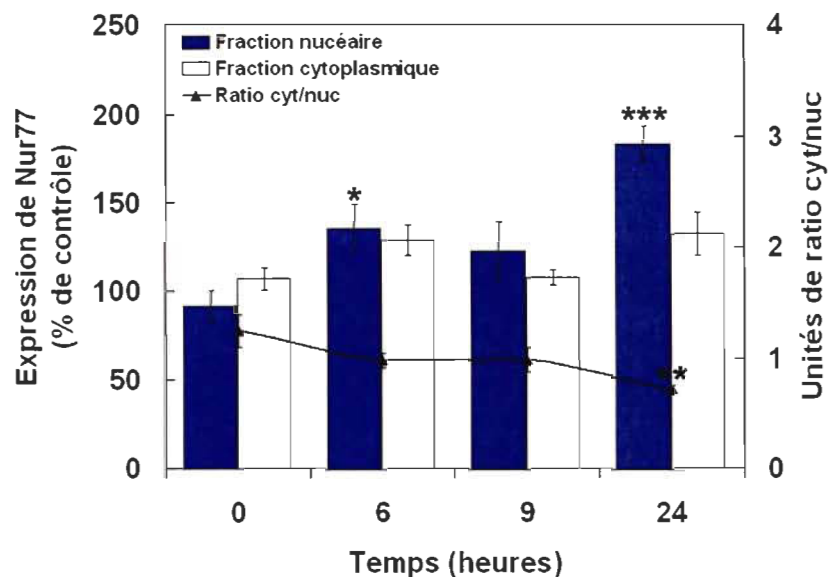


FIGURE 3.06 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement au DHA.

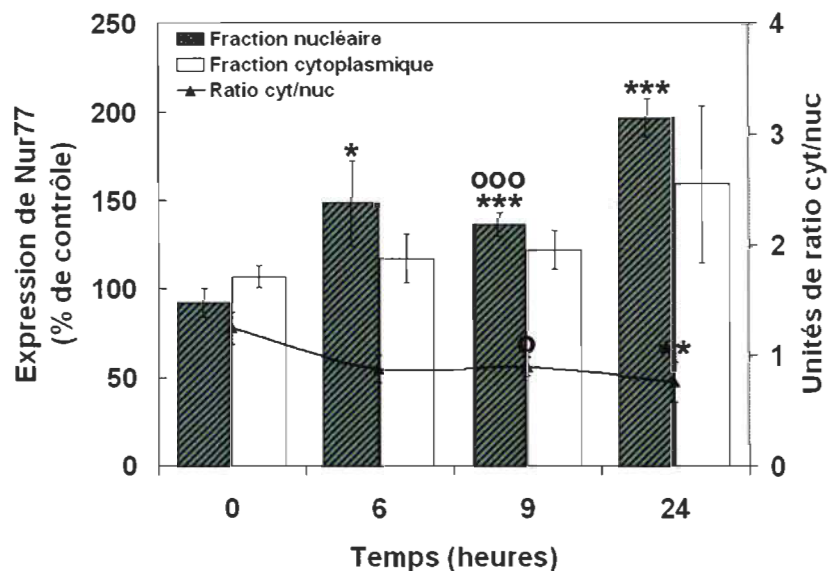


FIGURE 3.07 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au pré-traitement au DHA et au traitement au MPP+.

Le pré-traitement au DHA diminue aussi la translocation de Nur77 induite par la 6-OHDA (Figure 3.08). Après un pré-traitement au DHA et un traitement de 6, 9 et 24 heures à la 6-OHDA, il y a une forte augmentation de l'expression de Nur77 dans la fraction nucléaire. À 6 heures, cette augmentation est accompagnée d'une diminution de l'expression de Nur77 dans la fraction cytoplasmique. Le pré-traitement au DHA augmente l'expression de Nur77 dans le noyau et diminue son expression dans le cytoplasme à 9 heures de traitement par rapport au traitement à la 6-OHDA seulement et le ratio cyt/nuc est diminué après 9 heures de traitement.

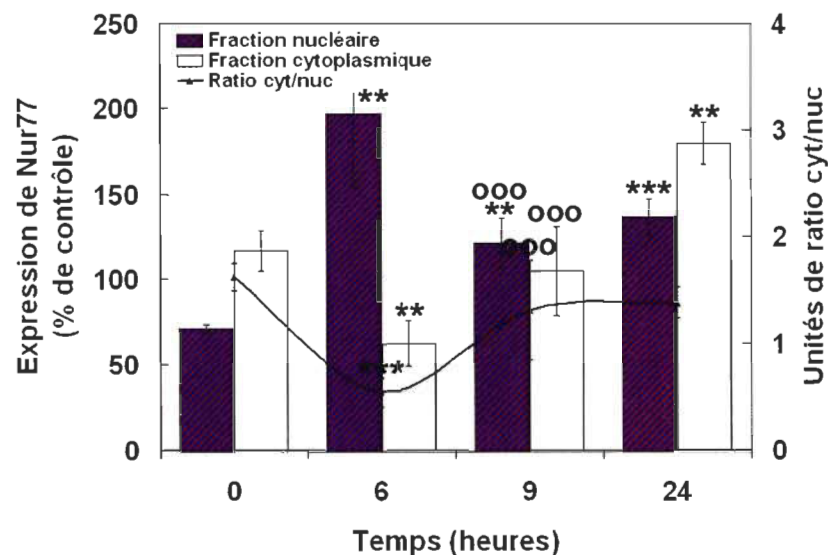


FIGURE 3.08 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au pré-traitement au DHA et au traitement à la 6-OHDA.

Afin de vérifier l'efficacité de l'extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires pour chaque condition, les membranes ont été décapées puis incubées avec les anticorps anti-TH et anti-HDAC1, des marqueurs spécifiques pour les protéines cytoplasmiques et nucléaires respectivement. La figure 3.09 représente le résultat de ces immunobuvardages pour la condition contrôle aux différents temps de traitement.

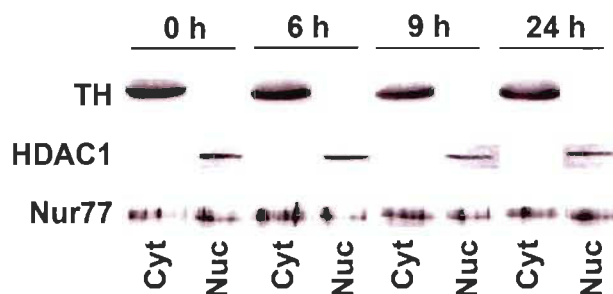


FIGURE 3.09 : Vérification de la séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires. Les poids moléculaires de Nur77, HDAC1 et de TH sont respectivement de 64, 60 et 62 kilodaltons.

3.4 Potentiel protecteur de l'E2 et du Resv sur la toxicité induite par la 6-OHDA

Le laboratoire de neurobiologie cellulaire de Dre Martinoli s'intéresse particulièrement à l'effet neuroprotecteur de molécules à caractère estrogénique dans le cadre de la MP. Suite aux résultats obtenus avec le DHA, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'E2 et du Resv sur l'induction de la translocation de Nur77. Suite aux résultats obtenus dans la section 3.2, nous avons décidé d'utiliser seulement la 6-OHDA comme neurotoxine puisqu'elle provoque une plus grande translocation de Nur77 vers le cytoplasme. Tout d'abord, les résultats présentés à la figure 3.10 montrent que le traitement de 24 heures à la 6-OHDA entraîne la mort de 50 % des cellules PC12, ce qui est comparable à la valeur obtenue à la figure 3.1. Alors que l'E2 et le Resv à une concentration de 10^{-7} M n'ont pas d'effet toxique sur les cellules, le traitement 3 heures avant l'ajout de la 6-OHDA diminue significativement le pourcentage de cytotoxicité à 30 % et 26 % respectivement. Les techniques de détection d'apoptose telles que la méthode du marquage au TUNEL peuvent détecter l'ADNss non-spécifique à l'apoptose. Nous avons donc utilisé un test ELISA qui dose spécifiquement l'ADNss de type apoptotique afin de mesurer l'apoptose des cellules PC12 suite aux mêmes traitements. La figure 3.11 montre qu'un traitement de 24 heures à la 6-OHDA augmente de façon significative le

pourcentage d'ADN fragmenté qui est de 155 % par rapport au contrôle fixé à 100 %. Le pré-traitement à l'E2 et au Resv diminue de façon significative le pourcentage à une valeur équivalente au contrôle, c'est-à-dire à 113 % et 115 % respectivement.

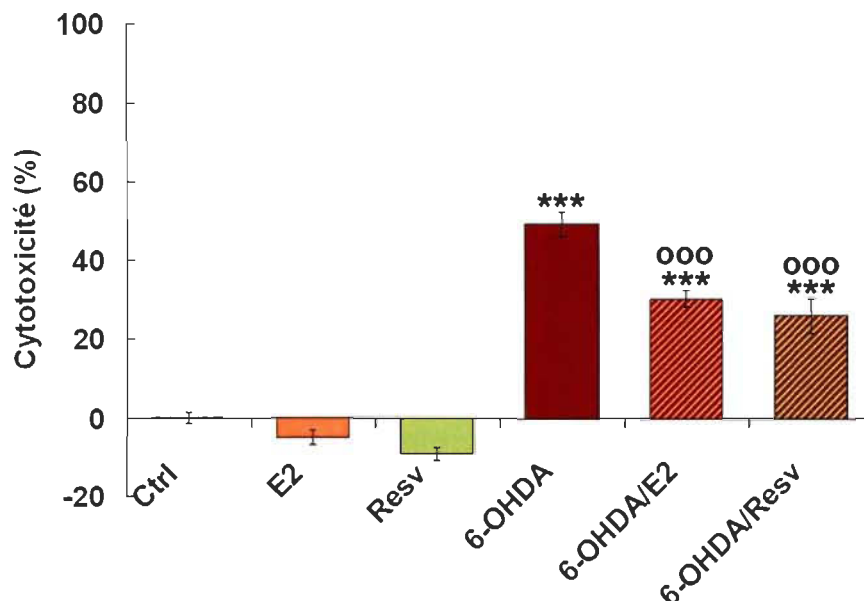


FIGURE 3.10 : Mesure de la mortalité cellulaire par la technique LDH suite au pré-traitement à l'E2 et au Resv et au traitement à la 6-OHDA.

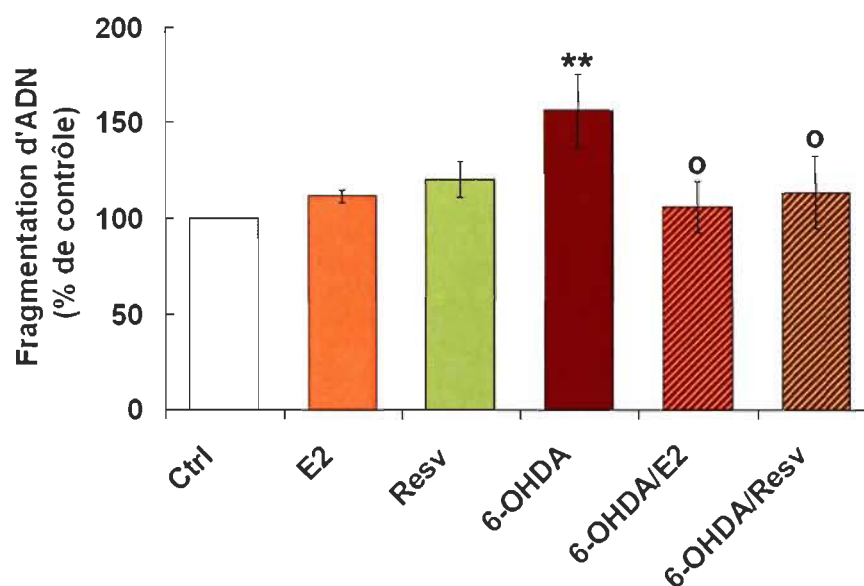


FIGURE 3.11 : Mesure de l'apoptose par la quantification de l'ADNss suite au pré-traitement à l'E2 ou au Resv et au traitement à la 6-OHDA.

3.5 Modulation de l'expression de Nur77 dans le cytoplasme et le noyau suite à un pré-traitement à l'E2 et au Resv et un traitement à la 6-OHDA

Des résultats apportés par la littérature mettent en évidence que l'E2 induit l'expression du RXR et de Nur77 (Celli et al., 1996; Cicatiello et al., 1993). Puisque l'E2 et le Resv protègent de la toxicité et de l'apoptose induite par la 6-OHDA, nous avons examiné l'effet de ces substances sur la translocation de Nur77 par immunobuvardage de type Western. Tout d'abord, nous avons déterminé l'effet de l'E2 (Figure 3.12) et du Resv (Figure 3.13) sur l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme des cellules PC12. La figure 3.12 montre que le traitement à l'E2 n'a aucun effet sur l'expression de Nur77 dans la fraction nucléaire, mais diminue l'expression de Nur77 dans le cytoplasme à 6, 9 et 24 heures de traitement par rapport au temps 0. De plus, le ratio cyt/nuc de Nur77 est diminué à 6 heures de traitement.

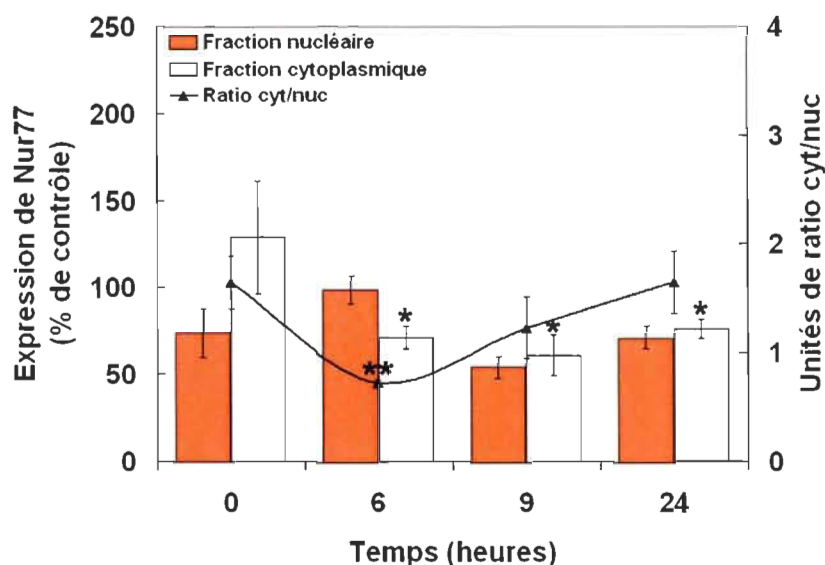


FIGURE 3.12 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement à l'E2.

Dans le cas du traitement au Resv, celui-ci n'a aucun effet significatif sur l'expression de Nur77 dans le cytoplasme, bien qu'il semble augmenter son expression à 9 heures de traitement (Figure 3.13). De plus, le Resv favorise

l'augmentation de l'expression de Nur77 dans le noyau et cette augmentation est significative à 24 heures de traitement (117 % par rapport à 42 % au temps 0). Par ailleurs, le ratio cyt/nuc n'est pas modifié par le traitement au Resv.

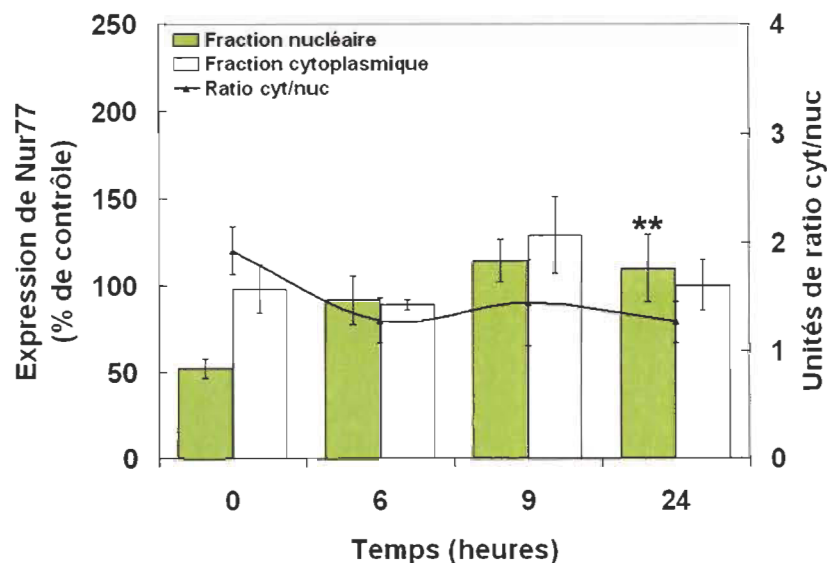


FIGURE 3.13 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement au Resv.

Afin de vérifier l'effet de l'E2 et du Resv sur la translocation de Nur77, nous avons refait le traitement avec la 6-OHDA afin de confirmer nos résultats obtenus précédemment. La figure 3.14 montre l'effet de la 6-OHDA sur l'expression de Nur77, et ce résultat est très semblable à celui obtenu à la figure 3.2 puisque la 6-OHDA, à 9 heures de traitement, augmente le ratio cyt/nuc à une valeur de 3 fois celle au temps 0.

Les résultats présentés à la figure 3.15 montrent que le traitement à l'E2 3 heures avant l'ajout de la 6-OHDA réduit de façon significative l'expression du Nur77 dans le cytoplasme à 6 et 9 heures et augmente son expression dans le noyau à 6 heures par rapport au temps 0. Le ratio cyt/nuc de Nur77 est diminué à 6 et 9 heures de traitement. Nos résultats montrent que le pré-traitement à l'E2 diminue significativement l'expression de Nur77 dans le cytoplasme à 9 heures de traitement et diminue le ratio cyt/nuc par rapport aux valeurs obtenues avec le traitement de 9 heures avec la 6-OHDA.

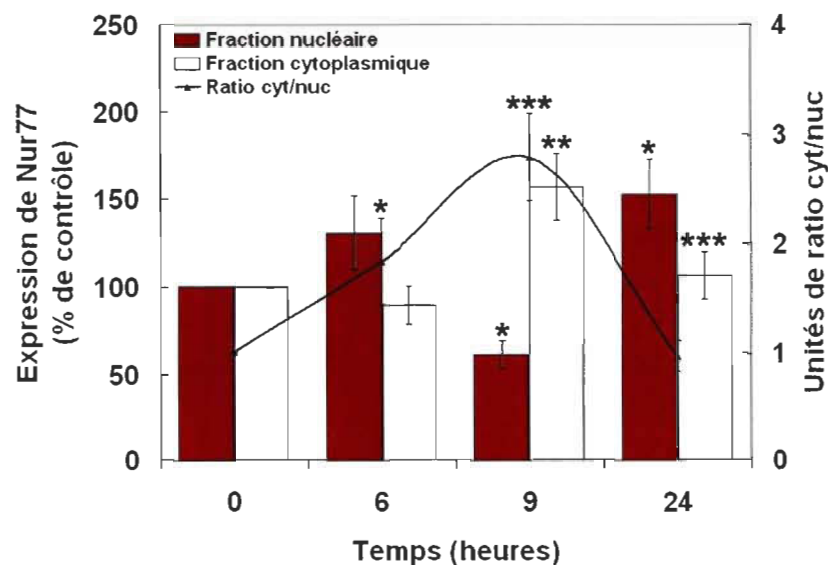


FIGURE 3.14 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au traitement à la 6-OHDA.

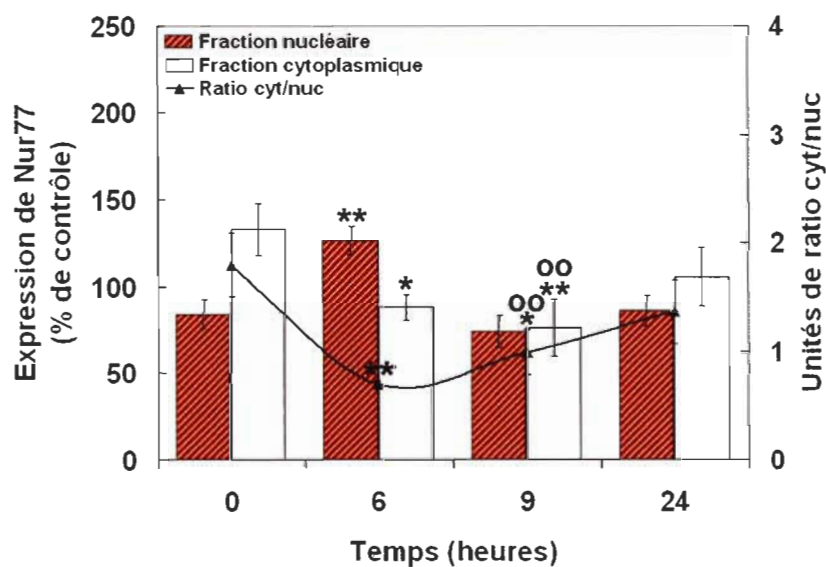


FIGURE 3.15 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au pré-traitement à l'E2 et au traitement à la 6-OHDA.

Contrairement à l'E2, nos résultats avec le Resv montrent que celui-ci ne diminue pas la translocation de Nur77 induite par la 6-OHDA (Figure 3.16). En effet, le traitement au Resv avant le traitement à la 6-OHDA provoque une augmentation de l'expression de Nur77 dans la fraction nucléaire au temps 6, 9

et 24 heures. Une augmentation de l'expression de Nur77 dans la fraction cytoplasmique est retrouvée après 24 heures de traitement. Par contre, le ratio cyt/nuc est inchangé aux différents temps de traitement par rapport au temps 0 et n'est pas significativement différent que le celui obtenu avec le traitement à la 6-OHDA.

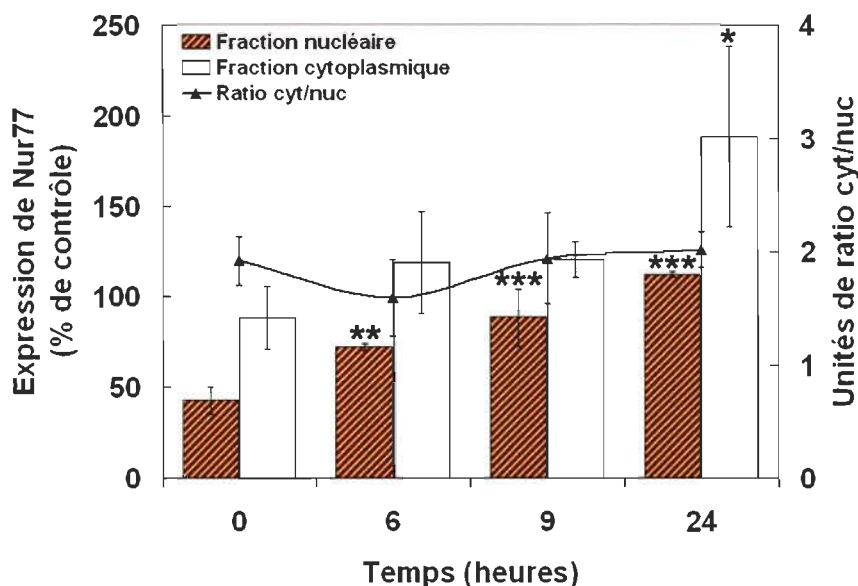


FIGURE 3.16 : Modulation de l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme suite au pré-traitement au Resv et au traitement à la 6-OHDA.

3.6 Vérification de l'interaction entre le DHA, l'E2 et le Resv avec l'hétérodimère Nur77/RXR

Le DHA est un ligand de grande affinité pour le RXR, contrairement à l'E2 et au Resv dont la liaison au RXR n'a pas encore été identifiée. Toutefois, il semble y avoir une interaction entre l'E2 et l'hétérodimère Nur77/RXR, la nature de celle-ci n'est pas connue (Cicatiello et al., 1993). Nous avons donc voulu vérifier la possible liaison de l'E2 à l'hétérodimère Nur77/RXR par co-immunoprécipitation des complexes nucléaires pour expliquer son effet sur la translocation de Nur77. Notre hypothèse était que la liaison d'un ligand à l'hétérodimère Nur77/RXR modifie la migration de celui-ci sur gel d'acrylamide. Après un pré-traitement de 3 heures avec le DHA, l'E2 et le Resv, nous avons extrait puis co-

immunoprécipité les complexes nucléaires avec l'anticorps anti-Nur77. Puis, un immunobuvardage de type Western, avec l'anticorps anti-RXR, a été effectué et le résultat est présenté à la figure 3.17.



FIGURE 3.17 : Immunobuvardage avec l'anticorps anti-RXR des complexes nucléaires immunoprécipités avec l'anticorps anti-Nur77 en conditions dénaturantes.

Nos résultats montrent que l'hétérodimère Nur77/RXR est présent dans le noyau des cellules PC12 dans la condition contrôle (Ctrl). De plus, le pré-traitement au DHA, à l'E2 et au Resv ne modifie pas la migration du complexe sur gel de polyacrylamide. Le contrôle négatif (Ctrl-) confirme la spécificité du test puisque, dans cette condition, les protéines n'étaient pas incubées avec l'anticorps anti-Nur77 lors de l'immunoprécipitation et il n'y a aucun signal lors de l'immunobuvardage.

Puisque l'immunobuvardage de type Western s'effectue dans des conditions dénaturantes en présence de SDS, et que ces conditions peuvent détruire le lien récepteur-ligand, nous avons répété l'expérience en effectuant une migration des complexes dans des conditions non-dénaturantes (sans SDS). Par contre, cette technique n'a pas permis de mettre en évidence la présence du complexe Nur77/RXR (résultats non montrés).

Suite à l'obtention des résultats de la figure 3.17, nous avons voulu déterminer si l'ajout d'un antagoniste du RXR, le HX531, pouvait empêcher la liaison du DHA au RXR, inhiber l'effet du DHA sur la translocation de Nur77 et de cette façon restreindre l'effet neuroprotecteur du DHA mesurée par la LDH. Par cette méthode, nous voulions ensuite déterminer l'effet de cet antagoniste sur la protection induite par l'E2 pour mettre en évidence une possible interaction.

Pour ce faire, nous avons ajouté le HX531 à la même concentration que le DHA (1 μ M) au pré-traitement en même temps que le DHA pour que les deux molécules compétitionnent pour la liaison au RXR (Figure 3.18). Nos résultats montrent que l'ajout du HX531 diminue à une valeur de 23 % la mortalité induite par le 6-OHDA, alors que le traitement au DHA combiné au HX531 entraîne un pourcentage intermédiaire de 28 %. Puisque l'effet protecteur du HX531 n'était pas le résultat attendu, nous n'avons pas effectué cette expérimentation avec l'E2 et le Resv. Ce résultat surprenant sera expliqué dans la conclusion de ce mémoire.

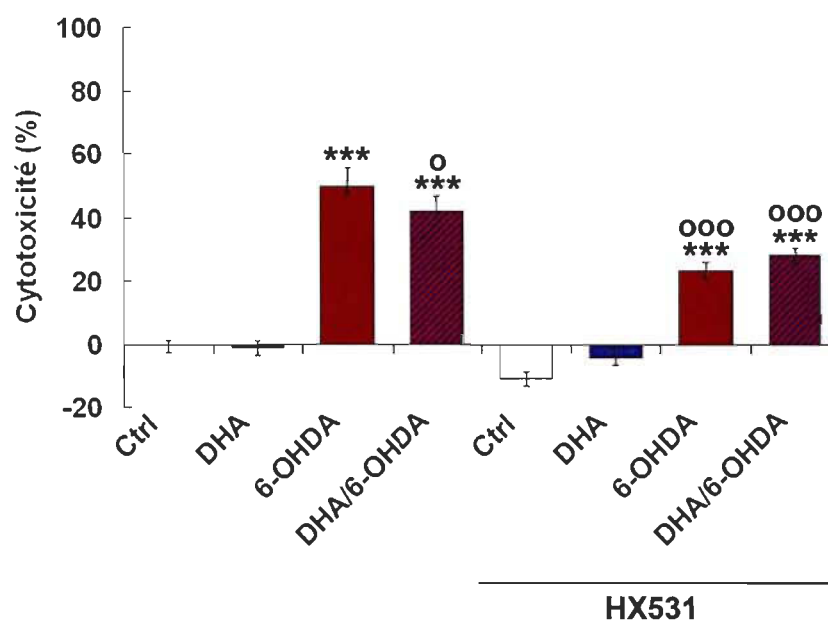


FIGURE 3.18 : Mesure de la cytotoxicité par la technique LDH lors de l'ajout d'un antagoniste du RXR, le HX531, en même temps que le DHA.

CHAPITRE 4

CONCLUSIONS

4.1 Principales conclusions apportées par les résultats obtenus

Les travaux présentés ci-dessus répondent aux deux objectifs principaux énoncés dans l'introduction. Premièrement, nous avons vérifié l'effet neuroprotecteur d'un acide gras oméga-3 qui est aussi un ligand du RXR, le DHA, envers la toxicité induite par deux neurotoxines oxydantes, le MPP⁺ et la 6-OHDA, dans les cellules PC12 naïves en culture. Nous avons aussi vérifié l'effet du traitement au MPP⁺ et à la 6-OHDA sur la translocation de Nur77 vers le cytoplasme et l'effet du DHA sur cette translocation. Ces résultats seront inclus dans un article en collaboration avec Claude Rouillard de l'Université Laval. Puisque des indices supportent une interaction entre l'E2, le RXR et Nur77, notre deuxième objectif a été de vérifier l'effet de l'E2 et d'un phytoestrogène, le Resv, sur la translocation de Nur77 induite par la 6-OHDA. Ensuite, nous avons voulu comprendre la nature de l'interaction entre l'E2 et Nur77.

Tout d'abord, nos résultats de cytotoxicité par la mesure de la LDH montrent que le pré-traitement de 3 heures avec le DHA à une concentration de 1 μ M protège les cellules PC12 de la toxicité induite par le MPP⁺ 5 mM (Figure 3.01) et la 6-OHDA 30 μ M (Figure 3.02). Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui suggèrent un effet neuroprotecteur du DHA à des concentrations entre 0,5 et 100 μ M (Akbar et al., 2006; Florent et al., 2006; Kaur et al., 2008; Kim et al., 2000). Par contre, le temps de pré-traitement avec le DHA était de 24 heures dans toutes ces études, et l'effet neuroprotecteur était relié à l'incorporation du DHA dans les membranes cellulaires (Akbar et al., 2006; Kim et al., 2000). Puisque le DHA est incorporé rapidement dans les membranes des cellules PC12, c'est-à-dire après 2 heures de traitement

(Ikemoto et al., 1999; Richardson and Wurtman, 2007), il n'est pas surprenant d'avoir une protection après un pré-traitement de 3 heures.

Le marquage de Nur77 par immunofluorescence a été utilisé afin de mieux représenter la présence de Nur77 au niveau cellulaire. Nous avons ensuite démontré par immunobuvardage de type Western que le traitement avec le MPP+ et la 6-OHDA favorise la translocation de Nur77 vers le cytoplasme après 9 heures de traitement (Figures 3.03, 3.04 et 3.05). Par contre, cette translocation n'est pas observée à 24 heures de traitement où il y a une augmentation de la cytotoxicité et de la fragmentation de l'ADN. Ce résultat peut être expliqué par le fait qu'à 9 heures de traitement, lorsque les marqueurs apoptotiques sont augmentés (résultats non montrés), la cascade apoptotique est enclenchée. C'est alors que la translocation de Nur77 est observée, et celle-ci précède l'apoptose des cellules qui est mesurée à 24 heures. D'autres études ont démontré un lien direct entre la translocation ou l'expression de Nur77 lors de la génération d'un stress oxydant. Par exemple, il a été démontré que, lors d'un traitement avec un agent anti-cancéreux, la translocation de Nur77 précède l'apoptose induite par un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Liang et al., 2007). De plus, le glutamate et le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), deux agents reconnus pour induire un stress oxydant, entraînent la translocation de Nur77 et l'apoptose (Jacobs et al., 2004; Li et al., 2000). Bien que le rôle précis de Nur77 dans l'apoptose et la génération d'un stress oxydant reste à être déterminé, la translocation de Nur77 pourrait être un des mécanismes impliqués lors de l'induction de l'apoptose par des neurotoxines oxydantes.

Puisque le DHA est un ligand du partenaire d'hétérodimérisation de Nur77, le RXR, nous avons déterminé l'effet d'un pré-traitement sur la translocation de Nur77. Alors que le traitement au DHA n'a aucun effet sur la localisation de Nur77 (Figure 3.07), le pré-traitement au DHA réduit la translocation de Nur77 induite par le MPP+ (Figure 3.08) et la 6-OHDA (Figure 3.09). Ces résultats

suggèrent donc que le DHA pourrait protéger les cellules PC12 de la toxicité du MPP⁺ et de la 6-OHDA en limitant la translocation de Nur77 dans le cytoplasme.

Nous avons aussi démontré que l'E2 et le Resv protègent les cellules PC12 de la toxicité (Figure 3.10) et de l'apoptose (Figure 3.11) induite par le traitement à la 6-OHDA. Nos résultats montrent que le traitement à l'E2 tend à diminuer la quantité de Nur77 dans le cytoplasme (Figure 3.12) et que le pré-traitement à l'E2 permet de diminuer la translocation de Nur77 induite par la 6-OHDA (Figure 3.15). Ce résultat est très intéressant puisque certaines études supportent une interaction entre l'E2, Nur77 et le RXR et que le ERR a été identifié comme nouveau partenaire d'hétérodimérisation de Nur77 (Celli et al., 1996; Cicatiello et al., 1993; Lammi et al., 2007). Par ailleurs, nous avons montré que le Resv ne semble pas agir sur la translocation de Nur77 (Figure 3.16). Étant donné que le Resv est un phytoestrogène et qu'il possède des activités pro- et anti-estrogéniques (Basly et al., 2000), il n'est pas surprenant que son mécanisme d'action soit différent de l'E2 dans notre modèle d'étude.

Nous avons ensuite voulu déterminer par immunobuvardage de type Western des complexes nucléaires immunoprécipités s'il était possible de voir une différence dans la migration des complexes par l'addition d'un ligand. Nos résultats présentés à la figure 3.17 ne permettent pas de mettre en évidence une différence dans la migration sur gel d'acrylamide du complexe Nur77 et RXR. Par contre, ce résultat permet de confirmer la présence de l'hétérodimère dans le noyau des PC12. En procédant à l'addition d'un antagoniste du RXR, le HX531, nous avons voulu vérifier si son ajout en même temps qu'un ligand du RXR, le DHA, diminuait la neuroprotection induite par le DHA en empêchant sa liaison au LBD. Par contre, nos résultats montrent que l'antagoniste à lui seul diminue fortement la mortalité induite par la 6-OHDA (Figure 3.18). Si on tient compte l'hypothèse que la liaison d'un ligand RXR à l'hétérodimère Nur77/RXR empêche sa translocation vers le cytoplasme, la liaison du HX531 pourrait avoir

le même effet et protéger les cellules. De plus, ces résultats suggèrent que l'effet neuroprotecteur de la liaison des ligands au RXR n'implique pas d'effet génomique, puisque l'antagoniste du RXR diminue la cytotoxicité.

4.2 Perspectives de recherche

Il ne va pas sans dire que le projet ouvre plusieurs perspectives de recherche fort captivantes. Tout d'abord, le mécanisme par lequel l'E2, contrairement au Resv, diminue la translocation de Nur77 induite par la 6-OHDA devrait être approfondi. Pour ce faire, il serait possible d'aller vérifier une possible interaction entre le ER et Nur77 par co-immunoprécipitation des complexes nucléaires et immunobuvardage de type Western avec un anticorps dirigé contre le ER. Par ailleurs, il serait possible de vérifier l'absence d'interaction entre Nur77 et le Resv par la même méthode, mais avec un immunobuvardage avec un nouvel anticorps dirigé contre le Resv (Gemacbio antibodies). Puisque l'expression endogène de Nur77 dans les cellules PC12 naïves est faible (Fahrner et al., 1990), l'utilisation de Nur77 combiné à une GFP (protéine fluorescence verte) serait utile pour confirmer certains de nos résultats sur la redistribution intracellulaire de Nur77. Aussi, puisque Nur77 est un IEG induit par le traitement au NGF dans les PC12 (Milbrandt, 1988), les expérimentations pourraient être répétées dans ce modèle cellulaire.

Puisque Nur77 est un agent double et que son rôle diffère selon sa localisation cytoplasmique et nucléaire, l'étude de sa localisation dans les modèles *in vivo* permettrait de mieux comprendre son mécanisme d'action. En effet, les niveaux d'expression de l'ARNm de Nur77 sont modifiés dans le striatum suite à l'administration de L-dopa et/ou de 6-OHDA (St-Hilaire et al., 2003, 2005), et l'expression de Nur77 dans le noyau et le cytoplasme n'a pas été évaluée.

Dans un autre ordre d'idées, il faudrait étudier le mécanisme d'action de Nur77 dans le cytoplasme. En effet, il semblerait que le niveau de phosphorylation de

Nur77 influence sa localisation cellulaire (Fahrner et al., 1990). Il serait donc intéressant de voir l'effet des neurotoxines sur le niveau de phosphorylation de Nur77, ce qui pourrait expliquer leur effet sur la translocation de Nur77. Aussi, de nouvelles cibles cytoplasmiques de Nur77 ont été identifiées. En effet, il faudrait évaluer l'interaction entre Nur77 et une nouvelle molécule anti-apoptotique de la famille Bcl-2, nommée Bcl-B, dont le phénotype est inversé par l'interaction avec Nur77 (Luciano et al., 2007). Une autre avenue du projet pourrait consister en l'étude de l'effet des traitements sur la libération de calcium du réticulum endoplasmique puisque Nur77 semble y avoir un effet (Liang et al., 2007).

En guise de conclusion, je crois que ces résultats ouvrent la fenêtre sur plusieurs voies de recherche sur les mécanismes d'action intracellulaires de Nur77 et ces partenaires dans le système dopaminergique et dans les modèles de dégénérescence dopaminergique comme la MP. Nous ne connaissons pas les causes exactes de cette maladie dégénérative qui touche de plus en plus la population vieillissante, mais plusieurs évidences suggèrent qu'une thérapie préventive serait bénéfique. Les résultats obtenus pour le DHA, l'E2 et le Resv confirment donc que certaines molécules d'origine naturelle ont la propriété de protéger les neurones de dommages neurotoxiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahuja, H. S., A. Szanto, L. Nagy, and P. J. Davies, 2003, The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death: *J Biol Regul Homeost Agents*, v. 17, p. 29-45.
- Akbar, M., J. Baick, F. Calderon, Z. Wen, and H. Y. Kim, 2006, Ethanol promotes neuronal apoptosis by inhibiting phosphatidylserine accumulation: *J Neurosci Res*, v. 83, p. 432-40.
- Akbar, M., F. Calderon, Z. Wen, and H. Y. Kim, 2005, Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, p. 10858-63.
- Alessandri, J. M., P. Guesnet, S. Vancassel, P. Astorg, I. Denis, B. Langelier, S. Aid, C. Poumes-Ballihaut, G. Champeil-Potokar, and M. Lavialle, 2004, Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life: *Reprod Nutr Dev*, v. 44, p. 509-38.
- Alves, G., E. B. Forsaa, K. F. Pedersen, M. Dreetz Gjerstad, and J. P. Larsen, 2008, Epidemiology of Parkinson's disease: *J Neurol*, v. 255 Suppl 5, p. 18-32.
- Ambani, L. M., M. H. Van Woert, and S. Murphy, 1975, Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease: *Arch Neurol*, v. 32, p. 114-8.
- Amorati, R., M. Lucarini, V. Mugnaini, and G. F. Pedulli, 2003, Antioxidant activity of o-bisphenols: the role of intramolecular hydrogen bonding: *J Org Chem*, v. 68, p. 5198-204.
- Andrew, R., D. G. Watson, S. A. Best, J. M. Midgley, H. Wenlong, and R. K. Petty, 1993, The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls: *Neurochem Res*, v. 18, p. 1175-7.
- Anekonda, T. S., 2006, Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease?: *Brain Res Rev*, v. 52, p. 316-26.
- Aquilano, K., S. Baldelli, G. Rotilio, and M. R. Ciriolo, 2008, Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease: A Review on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Polyphenols: *Neurochem Res*.

- Arab, K., A. Rossary, F. Flourie, Y. Tourneur, and J. P. Steghens, 2006, Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gamma-glutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase: *Br J Nutr*, v. 95, p. 18-26.
- Aranda, A., and A. Pascual, 2001, Nuclear hormone receptors and gene expression: *Physiol Rev*, v. 81, p. 1269-304.
- Asanuma, M., I. Miyazaki, and N. Ogawa, 2003, Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease: *Neurotox Res*, v. 5, p. 165-76.
- ASRM, P. C. o., 2008, Estrogen and progestogen therapy in postmenopausal women: *Fertil Steril*, v. 90, p. S88-102.
- Barberger-Gateau, P., L. Letenneur, V. Deschamps, K. Peres, J. F. Dartigues, and S. Renaud, 2002, Fish, meat, and risk of dementia: cohort study: *Bmj*, v. 325, p. 932-3.
- Basly, J. P., F. Marre-Fournier, J. C. Le Bail, G. Habrioux, and A. J. Chulia, 2000, Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol: *Life Sci*, v. 66, p. 769-77.
- Bate, C., V. Marshall, L. Colombo, L. Diomedea, M. Salmona, and A. Williams, 2008, Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids increase neuronal death in response to HuPrP82-146 and A β 1-42: *Neuropharmacology*, v. 54, p. 934-43.
- Bazan, N. G., 2005, Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress: *Brain Pathol*, v. 15, p. 159-66.
- Beal, M. F., 2005, Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration: *Ann Neurol*, v. 58, p. 495-505.
- Beaudry, G., M. C. Langlois, I. Weppe, C. Rouillard, and D. Levesque, 2000, Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain: *J Neurochem*, v. 75, p. 1694-702.
- Behl, C., 2002, Oestrogen as a neuroprotective hormone: *Nat Rev Neurosci*, v. 3, p. 433-42.

- Ben-Shachar, D., P. Riederer, and M. B. Youdim, 1991, Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease: *J Neurochem*, v. 57, p. 1609-14.
- Bezard, J., J. P. Blond, A. Bernard, and P. Clouet, 1994, The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues: *Reprod Nutr Dev*, v. 34, p. 539-68.
- Blanchet, J., F. Longpre, G. Bureau, M. Morissette, T. DiPaolo, G. Bronchti, and M. G. Martinoli, 2008, Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice: *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 32, p. 1243-50.
- Borie, C., F. Gasparini, P. Verpillat, A. M. Bonnet, Y. Agid, G. Hetet, A. Brice, A. Durr, and B. Grandchamp, 2002, Association study between iron-related genes polymorphisms and Parkinson's disease: *J Neurol*, v. 249, p. 801-4.
- Bousquet, M., M. Saint-Pierre, C. Julien, N. Salem, Jr., F. Cicchetti, and F. Calon, 2008, Beneficial effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid on toxin-induced neuronal degeneration in an animal model of Parkinson's disease: *Faseb J*, v. 22, p. 1213-25.
- Bove, J., D. Prou, C. Perier, and S. Przedborski, 2005, Toxin-induced models of Parkinson's disease: *NeuroRx*, v. 2, p. 484-94.
- Bowers, J. L., V. V. Tyulmenkov, S. C. Jernigan, and C. M. Klinge, 2000, Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta: *Endocrinology*, v. 141, p. 3657-67.
- Brann, D. W., K. Dhandapani, C. Wakade, V. B. Mahesh, and M. M. Khan, 2007, Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications: *Steroids*, v. 72, p. 381-405.
- Bureau, G., F. Longpre, and M. G. Martinoli, 2008, Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation: *J Neurosci Res*, v. 86, p. 403-10.
- Calon, F., and G. Cole, 2007, Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: Evidence from animal studies: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 77, p. 287-293.

- Cao, D., R. Xue, J. Xu, and Z. Liu, 2005, Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures: *J Nutr Biochem*, v. 16, p. 538-46.
- Cao, X., W. Liu, F. Lin, H. Li, S. K. Kolluri, B. Lin, Y. H. Han, M. I. Dawson, and X. K. Zhang, 2004, Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting: *Mol Cell Biol*, v. 24, p. 9705-25.
- Castro-Obregon, S., R. V. Rao, G. del Rio, S. F. Chen, K. S. Poksay, S. Rabizadeh, S. Vesce, X. K. Zhang, R. A. Swanson, and D. E. Bredesen, 2004, Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77: *J Biol Chem*, v. 279, p. 17543-53.
- Celli, G., N. Darwiche, and L. M. De Luca, 1996, Estrogen induces retinoid receptor expression in mouse cervical epithelia: *Exp Cell Res*, v. 226, p. 273-82.
- Chalon, S., 2006, Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 75, p. 259-69.
- Chen, H., S. M. Zhang, M. A. Hernan, W. C. Willett, and A. Ascherio, 2003, Dietary intakes of fat and risk of Parkinson's disease: *Am J Epidemiol*, v. 157, p. 1007-14.
- Chinta, S. J., and J. K. Andersen, 2008, Redox imbalance in Parkinson's disease: *Biochim Biophys Acta*, v. 1780, p. 1362-7.
- Choi, W. S., S. Y. Yoon, T. H. Oh, E. J. Choi, K. L. O'Malley, and Y. J. Oh, 1999, Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK: *J Neurosci Res*, v. 57, p. 86-94.
- Cicatiello, L., V. Sica, F. Bresciani, and A. Weisz, 1993, Identification of a specific pattern of "immediate-early" gene activation induced by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells: *Receptor*, v. 3, p. 17-30.
- Clark, I. E., M. W. Dodson, C. Jiang, J. H. Cao, J. R. Huh, J. H. Seol, S. J. Yoo, B. A. Hay, and M. Guo, 2006, *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin: *Nature*, v. 441, p. 1162-6.
- Cookson, M. R., 2009, alpha-Synuclein and neuronal cell death: *Mol Neurodegener*, v. 4, p. 9.

- Danielson, S. R., and J. K. Andersen, 2008, Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease: *Free Radic Biol Med*, v. 44, p. 1787-94.
- Dauer, W., and S. Przedborski, 2003, Parkinson's disease: mechanisms and models: *Neuron*, v. 39, p. 889-909.
- Davis, I. J., T. G. Hazel, R. H. Chen, J. Blenis, and L. F. Lau, 1993, Functional domains and phosphorylation of the orphan receptor Nur77: *Mol Endocrinol*, v. 7, p. 953-64.
- Dawson, T. M., and V. L. Dawson, 2003, Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease: *Science*, v. 302, p. 819-22.
- de la Lastra, C. A., and I. Villegas, 2007, Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications: *Biochem Soc Trans*, v. 35, p. 1156-60.
- de Lau, L. M., M. Bornebroek, J. C. Witteman, A. Hofman, P. J. Koudstaal, and M. M. Breteler, 2005, Dietary fatty acids and the risk of Parkinson disease: the Rotterdam study: *Neurology*, v. 64, p. 2040-5.
- de Leseleuc, L., and F. Denis, 2006, Inhibition of apoptosis by Nur77 through NF-kappaB activity modulation: *Cell Death Differ*, v. 13, p. 293-300.
- de Urquiza, A. M., S. Liu, M. Sjoberg, R. H. Zetterstrom, W. Griffiths, J. Sjoval, and T. Perlmann, 2000, Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain: *Science*, v. 290, p. 2140-4.
- Deng, H., W. Le, Y. Guo, C. B. Hunter, W. Xie, M. Huang, and J. Jankovic, 2006, Genetic analysis of LRRK2 mutations in patients with Parkinson disease: *J Neurol Sci*, v. 251, p. 102-6.
- Dhandapani, K. M., and D. W. Brann, 2007, Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection: *Exp Gerontol*, v. 42, p. 70-5.
- Elbaz, A., and C. Tranchant, 2007, Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease: *J Neurol Sci*, v. 262, p. 37-44.
- Estus, S., W. J. Zaks, R. S. Freeman, M. Gruda, R. Bravo, and E. M. Johnson, Jr., 1994, Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis: *J Cell Biol*, v. 127, p. 1717-27.

- Ethier, I., H. Kagechika, K. Shudo, C. Rouillard, and D. Levesque, 2004, Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: involvement of Nur77 and retinoid receptors: *Biol Psychiatry*, v. 56, p. 522-6.
- Fahn, S., 2008, The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease: *Mov Disord*, v. 23 Suppl 3, p. S497-508.
- Fahrner, T. J., S. L. Carroll, and J. Milbrandt, 1990, The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally: *Mol Cell Biol*, v. 10, p. 6454-9.
- Filomeni, G., I. Graziani, G. Rotilio, and M. R. Ciriolo, 2007, trans-Resveratrol induces apoptosis in human breast cancer cells MCF-7 by the activation of MAP kinases pathways: *Genes Nutr*, v. 2, p. 295-305.
- Fitzpatrick, L. A., 1999, Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the postmenopausal women: *Mayo Clin Proc*, v. 74, p. 601-7.
- Florent, S., C. Malaplate-Armand, I. Youssef, B. Kriem, V. Koziel, M. C. Escanye, A. Fife, I. Sponne, B. Leininger-Muller, J. L. Olivier, T. Pillot, and T. Oster, 2006, Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers: *J Neurochem*, v. 96, p. 385-95.
- Fukae, J., Y. Mizuno, and N. Hattori, 2007, Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: *Mitochondrion*, v. 7, p. 58-62.
- Gagne, B., S. Gelinas, G. Bureau, B. Lagace, C. Ramassamy, K. Chiasson, B. Valastro, and M. G. Martinoli, 2003, Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress: *Endocrine*, v. 21, p. 89-95.
- Galvan, A., and T. Wichmann, 2008, Pathophysiology of parkinsonism: *Clin Neurophysiol*, v. 119, p. 1459-74.
- Gandhi, S., and N. W. Wood, 2005, Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: *Hum Mol Genet*, v. 14 Spec No. 2, p. 2749-2755.
- Gehm, B. D., J. M. McAndrews, P. Y. Chien, and J. L. Jameson, 1997, Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 14138-43.

- Gelinas, S., G. Bureau, B. Valastro, G. Massicotte, F. Cicchetti, K. Chiasson, B. Gagne, J. Blanchet, and M. G. Martinoli, 2004, Alpha and beta estradiol protect neuronal but not native PC12 cells from paraquat-induced oxidative stress: *Neurotox Res*, v. 6, p. 141-8.
- Gelinas, S., and M. G. Martinoli, 2002, Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells: *J Neurosci Res*, v. 70, p. 90-6.
- Gilbert, F., M. Morissette, M. St-Hilaire, B. Paquet, C. Rouillard, T. Di Paolo, and D. Levesque, 2006, Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover: *Biol Psychiatry*, v. 60, p. 538-47.
- Gochfeld, M., and J. Burger, 2005, Good fish/bad fish: a composite benefit-risk by dose curve: *Neurotoxicology*, v. 26, p. 511-20.
- Goldberg, M. S., and P. T. Lansbury, Jr., 2000, Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease?: *Nat Cell Biol*, v. 2, p. E115-9.
- Gollapudi, L., and M. M. Oblinger, 1999, Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ER α): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation: *J Neurosci Res*, v. 56, p. 99-108.
- Greene, L. A., and A. S. Tischler, 1976, Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 73, p. 2424-8.
- Haan, C., and I. Behrmann, 2007, A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background: *J Immunol Methods*, v. 318, p. 11-9.
- Hazel, T. G., R. Misra, I. J. Davis, M. E. Greenberg, and L. F. Lau, 1991, Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment: *Mol Cell Biol*, v. 11, p. 3239-46.
- Hazel, T. G., D. Nathans, and L. F. Lau, 1988, A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, p. 8444-8.
- Henn, I. H., L. Bouman, J. S. Schlehe, A. Schlierf, J. E. Schramm, E. Wegener, K. Nakaso, C. Culmsee, B. Berninger, D. Krappmann, J. Tatzelt, and K. F. Winklhofer, 2007, Parkin mediates neuroprotection through activation of

- IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB signaling: *J Neurosci*, v. 27, p. 1868-78.
- Hirata, Y., K. Kiuchi, H. C. Chen, J. Milbrandt, and G. Guroff, 1993, The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B: *J Biol Chem*, v. 268, p. 24808-12.
- Honkaniemi, J., and F. R. Sharp, 1999, Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures: *Eur J Neurosci*, v. 11, p. 10-7.
- Hornykiewicz, O., 2006, The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain: *J Neural Transm Suppl*, p. 9-15.
- Horrocks, L. A., and A. A. Farooqui, 2004, Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 70, p. 361-72.
- Hsu, H. C., T. Zhou, and J. D. Mountz, 2004, Nur77 family of nuclear hormone receptors: *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, v. 3, p. 413-23.
- Hunot, S., and E. C. Hirsch, 2003, Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease: *Ann Neurol*, v. 53 Suppl 3, p. S49-58; discussion S58-60.
- Huppmann, S., S. Romer, R. Altmann, M. Obladen, and M. Berns, 2008, 17beta-Estradiol attenuates hyperoxia-induced apoptosis in mouse C8-D1A cell line: *J Neurosci Res*.
- Ikemoto, A., T. Kobayashi, K. Emoto, M. Umeda, S. Watanabe, and H. Okuyama, 1999, Effects of docosahexaenoic and arachidonic acids on the synthesis and distribution of aminophospholipids during neuronal differentiation of PC12 cells: *Arch Biochem Biophys*, v. 364, p. 67-74.
- Innis, S. M., 2007, Dietary (n-3) fatty acids and brain development: *J Nutr*, v. 137, p. 855-9.
- Jacobs, C. M., K. A. Boldingh, H. H. Slagsvold, G. H. Thoresen, and R. E. Paulsen, 2004, ERK2 prohibits apoptosis-induced subcellular translocation of orphan nuclear receptor NGFI-B/TR3: *J Biol Chem*, v. 279, p. 50097-101.

- Jacobs, C. M., and R. E. Paulsen, 2005, Crosstalk between ERK2 and RXR regulates nuclear import of transcription factor NGFI-B: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 336, p. 646-52.
- Jenner, P., 2003, Oxidative stress in Parkinson's disease: *Ann Neurol*, v. 53 Suppl 3, p. S26-36; discussion S36-8.
- Jin, F., Q. Wu, Y. F. Lu, Q. H. Gong, and J. S. Shi, 2008, Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats: *Eur J Pharmacol*.
- Jonsson, G., 1980, Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology: *Annu Rev Neurosci*, v. 3, p. 169-87.
- Jung, J. Y., K. H. Roh, Y. J. Jeong, S. H. Kim, E. J. Lee, M. S. Kim, W. M. Oh, H. K. Oh, and W. J. Kim, 2008, Estradiol protects PC12 cells against CoCl₂-induced apoptosis: *Brain Res Bull*, v. 76, p. 579-85.
- Kalivendi, S. V., S. Kotamraju, S. Cunningham, T. Shang, C. J. Hillard, and B. Kalyanaraman, 2003, 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced apoptosis and mitochondrial oxidant generation: role of transferrin-receptor-dependent iron and hydrogen peroxide: *Biochem J*, v. 371, p. 151-64.
- Kan, I., E. Melamed, D. Offen, and P. Green, 2007, Docosahexaenoic acid and arachidonic acid are fundamental supplements for the induction of neuronal differentiation: *J Lipid Res*, v. 48, p. 513-7.
- Katagiri, Y., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Ozato, and G. Guroff, 2000, Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B: *Nat Cell Biol*, v. 2, p. 435-40.
- Kaur, P., I. Heggland, M. Aschner, and T. Syversen, 2008, Docosahexaenoic acid may act as a neuroprotector for methylmercury-induced neurotoxicity in primary neural cell cultures: *Neurotoxicology*.
- Kim, H. Y., 2007, Novel metabolism of docosahexaenoic Acid in neural cells: *J Biol Chem*, v. 282, p. 18661-5.
- Kim, H. Y., M. Akbar, A. Lau, and L. Edsall, 2000, Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect: *J Biol Chem*, v. 275, p. 35215-23.

- King, V. R., W. L. Huang, S. C. Dylla, O. E. Curran, J. V. Priestley, and A. T. Michael-Titus, 2006, Omega-3 fatty acids improve recovery, whereas omega-6 fatty acids worsen outcome, after spinal cord injury in the adult rat: *J Neurosci*, v. 26, p. 4672-80.
- Kishida, E., M. Yano, M. Kasahara, and Y. Masuzawa, 1998, Distinctive inhibitory activity of docosahexaenoic acid against sphingosine-induced apoptosis: *Biochim Biophys Acta*, v. 1391, p. 401-8.
- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, and N. Shimizu, 1998, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism: *Nature*, v. 392, p. 605-8.
- Kolluri, S. K., N. Bruey-Sedano, X. Cao, B. Lin, F. Lin, Y. H. Han, M. I. Dawson, and X. K. Zhang, 2003, Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells: *Mol Cell Biol*, v. 23, p. 8651-67.
- Krezel, W., N. Ghyselinck, T. A. Samad, V. Dupe, P. Kastner, E. Borrelli, and P. Chambon, 1998, Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice: *Science*, v. 279, p. 863-7.
- Lagarde, M., N. Bernoud, F. Thies, N. Brossard, D. Lemaitre-Delaunay, M. Croset, and J. Lecerf, 2001, Lysophosphatidylcholine as a carrier of docosahexaenoic acid to target tissues: *World Rev Nutr Diet*, v. 88, p. 173-7.
- Lammi, J., A. M. Rajalin, J. Hupponen, and P. Aarnisalo, 2007, Cross-talk between the NR3B and NR4A families of orphan nuclear receptors: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 359, p. 391-7.
- Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrad, and I. Irwin, 1983, Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis: *Science*, v. 219, p. 979-80.
- Lee, C. S., W. J. Park, H. H. Ko, and E. S. Han, 2006, Differential involvement of mitochondrial permeability transition in cytotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine: *Mol Cell Biochem*, v. 289, p. 193-200.
- Lee, M. K., S. J. Kang, M. Poncz, K. J. Song, and K. S. Park, 2007, Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine: *Exp Mol Med*, v. 39, p. 376-84.

- Lengqvist, J., A. Mata De Urquiza, A. C. Bergman, T. M. Willson, J. Sjovall, T. Perlmann, and W. J. Griffiths, 2004, Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain: *Mol Cell Proteomics*, v. 3, p. 692-703.
- Leonardi, F., L. Attorri, R. D. Benedetto, A. D. Biase, M. Sanchez, F. P. Tregno, M. Nardini, and S. Salvati, 2007, Docosahexaenoic acid supplementation induces dose and time dependent oxidative changes in C6 glioma cells: *Free Radic Res*, v. 41, p. 748-56.
- Levesque, D., and C. Rouillard, 2007, Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation: *Trends Neurosci*, v. 30, p. 22-30.
- Li, H., S. K. Kolluri, J. Gu, M. I. Dawson, X. Cao, P. D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J. A. Fontana, J. C. Reed, and X. Zhang, 2000, Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3: *Science*, v. 289, p. 1159-64.
- Liang, B., X. Song, G. Liu, R. Li, J. Xie, L. Xiao, M. Du, Q. Zhang, X. Xu, X. Gan, and D. Huang, 2007, Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis: *Exp Cell Res*, v. 313, p. 2833-44.
- Liberatore, G. T., V. Jackson-Lewis, S. Vukosavic, A. S. Mandir, M. Vila, W. G. McAuliffe, V. L. Dawson, T. M. Dawson, and S. Przedborski, 1999, Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease: *Nat Med*, v. 5, p. 1403-9.
- Limousin, P., P. Krack, P. Pollak, A. Benazzouz, C. Ardouin, D. Hoffmann, and A. L. Benabid, 1998, Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease: *N Engl J Med*, v. 339, p. 1105-11.
- Lin, B., S. K. Kolluri, F. Lin, W. Liu, Y. H. Han, X. Cao, M. I. Dawson, J. C. Reed, and X. K. Zhang, 2004, Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3: *Cell*, v. 116, p. 527-40.
- Lipman, T., R. Tabakman, and P. Lazarovici, 2006, Neuroprotective effects of the stable nitroxide compound Tempol on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in the Nerve Growth Factor-differentiated model of pheochromocytoma PC12 cells: *Eur J Pharmacol*, v. 549, p. 50-7.

- Liu, B., and D. E. Dluzen, 2007, Oestrogen and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration: animal models and clinical reports of Parkinson's disease: *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 34, p. 555-65.
- Lotharius, J., and P. Brundin, 2002, Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein: *Nat Rev Neurosci*, v. 3, p. 932-42.
- Lu, K. T., M. C. Ko, B. Y. Chen, J. C. Huang, C. W. Hsieh, M. C. Lee, R. Y. Chiou, B. S. Wung, C. H. Peng, and Y. L. Yang, 2008, Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging: *J Agric Food Chem*, v. 56, p. 6910-3.
- Luciano, F., M. Krajewska, P. Ortiz-Rubio, S. Krajewski, D. Zhai, B. Faustin, J. M. Bruey, B. Bailly-Maitre, A. Lichtenstein, S. K. Kolluri, A. C. Satterthwait, X. K. Zhang, and J. C. Reed, 2007, Nur77 converts phenotype of Bcl-B, an antiapoptotic protein expressed in plasma cells and myeloma: *Blood*, v. 109, p. 3849-55.
- Maheux, J., I. Ethier, C. Rouillard, and D. Levesque, 2005, Induction patterns of transcription factors of the nur family (nurr1, nur77, and nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: implication for their mechanism of action: *J Pharmacol Exp Ther*, v. 313, p. 460-73.
- Maier, C. M., and P. H. Chan, 2002, Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders: *Neuroscientist*, v. 8, p. 323-34.
- Mandemakers, W., V. A. Morais, and B. De Strooper, 2007, A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases: *J Cell Sci*, v. 120, p. 1707-16.
- Manthey, D., and C. Behl, 2006, From structural biochemistry to expression profiling: neuroprotective activities of estrogen: *Neuroscience*, v. 138, p. 845-50.
- Marszalek, J. R., C. Kitidis, C. C. Dirusso, and H. F. Lodish, 2005, Long-chain acyl-CoA synthetase 6 preferentially promotes DHA metabolism: *J Biol Chem*, v. 280, p. 10817-26.
- Martin, R. E., 1998, Docosahexaenoic acid decreases phospholipase A2 activity in the neurites/nerve growth cones of PC12 cells: *J Neurosci Res*, v. 54, p. 805-13.

- Maruyama, K., T. Tsukada, N. Ohkura, S. Bandoh, T. Hosono, and K. Yamaguchi, 1998, The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review): *Int J Oncol*, v. 12, p. 1237-43.
- Maxwell, M. A., and G. E. Muscat, 2006, The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles: *Nucl Recept Signal*, v. 4, p. e002.
- McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes, and E. G. McGeer, 1988, Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains: *Neurology*, v. 38, p. 1285-91.
- McNaught, K. S., R. Belizaire, O. Isacson, P. Jenner, and C. W. Olanow, 2003, Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease: *Exp Neurol*, v. 179, p. 38-46.
- Merims, D., and M. Freedman, 2008, Cognitive and behavioural impairment in Parkinson's disease: *Int Rev Psychiatry*, v. 20, p. 364-73.
- Michael-Titus, A. T., 2007, Omega-3 fatty acids and neurological injury: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 77, p. 295-300.
- Milbrandt, J., 1988, Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene: *Neuron*, v. 1, p. 183-8.
- Mirnikjoo, B., S. E. Brown, H. F. Kim, L. B. Marangell, J. D. Sweatt, and E. J. Weeber, 2001, Protein kinase inhibition by omega-3 fatty acids: *J Biol Chem*, v. 276, p. 10888-96.
- Miyazaki, I., and M. Asanuma, 2008, Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself: *Acta Med Okayama*, v. 62, p. 141-50.
- Moll, U. M., N. Marchenko, and X. K. Zhang, 2006, p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction: *Oncogene*, v. 25, p. 4725-43.
- Morissette, M., S. Al Sweidi, S. Callier, and T. Di Paolo, 2008a, Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease: *Mol Cell Endocrinol*, v. 290, p. 60-9.
- Morissette, M., M. Le Saux, M. D'Astous, S. Jourdain, S. Al Sweidi, N. Morin, E. Estrada-Camarena, P. Mendez, L. M. Garcia-Segura, and T. Di Paolo,

- 2008b, Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain: *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 108, p. 327-38.
- Mukherjee, P. K., A. Chawla, M. S. Loayza, and N. G. Bazan, 2007, Docosanoids are multifunctional regulators of neural cell integrity and fate: significance in aging and disease: *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 77, p. 233-8.
- Nutt, J. G., 2008, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa: *Mov Disord*, v. 23 Suppl 3, p. S580-4.
- Nutt, J. G., J. P. Hammerstad, and S. T. Gancher, 1992, Parkinson's disease, 100 Maxims: 100 Maxims in Neurology: St. Louis, 169 p.
- Oakley, A. E., J. F. Collingwood, J. Dobson, G. Love, H. R. Perrott, J. A. Edwardson, M. Elstner, and C. M. Morris, 2007, Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease: *Neurology*, v. 68, p. 1820-5.
- Parkinson, J., 2002, An essay on the shaking palsy. 1817: *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, v. 14, p. 223-36; discussion 222.
- Pekarsky, Y., C. Hallas, A. Palamarchuk, A. Koval, F. Bullrich, Y. Hirata, R. Bichi, J. Letofsky, and C. M. Croce, 2001, Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 3690-4.
- Pirola, L., and S. Frojdo, 2008, Resveratrol: one molecule, many targets: *IUBMB Life*, v. 60, p. 323-32.
- Pollak, P., 2000, La maladie de Parkinson: Santé au quotidien: Paris, 176 p.
- Pozzi, S., V. Benedusi, A. Maggi, and E. Vegeto, 2006, Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation: *Ann N Y Acad Sci*, v. 1089, p. 302-23.
- Pubill, D., C. Chipana, A. Camins, M. Pallas, J. Camarasa, and E. Escubedo, 2005, Free radical production induced by methamphetamine in rat striatal synaptosomes: *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 204, p. 57-68.
- Radunovic, A., W. G. Porto, S. Zeman, and P. N. Leigh, 1997, Increased mitochondrial superoxide dismutase activity in Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis motor cortex: *Neurosci Lett*, v. 239, p. 105-8.

- Rastinejad, F., 2001, Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family: *Curr Opin Struct Biol*, v. 11, p. 33-8.
- Richardson, U. I., and R. J. Wurtman, 2007, Polyunsaturated fatty acids stimulate phosphatidylcholine synthesis in PC12 cells: *Biochim Biophys Acta*, v. 1771, p. 558-63.
- Riederer, P., E. Sofic, W. D. Rausch, B. Schmidt, G. P. Reynolds, K. Jellinger, and M. B. Youdim, 1989, Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains: *J Neurochem*, v. 52, p. 515-20.
- Robinson, P. A., 2008, Protein stability and aggregation in Parkinson's disease: *Biochem J*, v. 413, p. 1-13.
- Rocha-Gonzalez, H. I., M. Ambriz-Tututi, and V. Granados-Soto, 2008, Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases: *CNS Neurosci Ther*, v. 14, p. 234-47.
- Saito, H., R. Yamashiro, C. Alasalvar, and T. Konno, 1999, Influence of diet on fatty acids of three subtropical fish, subfamily Caesioninae (*Caesio diagramma* and *C. tile*) and family Siganidae (*Siganus canaliculatus*): *Lipids*, v. 34, p. 1073-82.
- Saito, Y., K. Nishio, Y. Ogawa, T. Kinumi, Y. Yoshida, Y. Masuo, and E. Niki, 2007, Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action: *Free Radic Biol Med*, v. 42, p. 675-85.
- Sakaki, J., K. Konishi, M. Kishida, H. Gunji, T. Kanazawa, H. Uchiyama, H. Fukaya, H. Mitani, and M. Kimura, 2007, Synthesis and structure-activity relationship of RXR antagonists based on the diazepinylbenzoic acid structure: *Bioorg Med Chem Lett*, v. 17, p. 4808-11.
- Samadi, P., L. Gregoire, C. Rouillard, P. J. Bedard, T. Di Paolo, and D. Levesque, 2006, Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys: *Ann Neurol*, v. 59, p. 282-8.
- Sasaki, S., A. Shirata, K. Yamane, and M. Iwata, 2004, Parkin-positive autosomal recessive juvenile Parkinsonism with alpha-synuclein-positive inclusions: *Neurology*, v. 63, p. 678-82.
- Schober, A., 2004, Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP: *Cell Tissue Res*, v. 318, p. 215-24.

- Shin, H. J., B. H. Lee, M. G. Yeo, S. H. Oh, J. D. Park, K. K. Park, J. H. Chung, C. K. Moon, and M. O. Lee, 2004, Induction of orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and its role in cadmium-induced apoptosis in lung: *Carcinogenesis*, v. 25, p. 1467-75.
- Shulman, L. M., 2007, Gender differences in Parkinson's disease: *Gend Med*, v. 4, p. 8-18.
- Shulman, L. M., R. L. Taback, J. Bean, and W. J. Weiner, 2001, Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease: *Mov Disord*, v. 16, p. 507-10.
- Simpkins, J. W., and J. A. Dykens, 2008, Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection: *Brain Res Rev*, v. 57, p. 421-30.
- Soto-Otero, R., E. Mendez-Alvarez, A. Hermida-Ameijeiras, A. M. Munoz-Patino, and J. L. Labandeira-Garcia, 2000, Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease: *J Neurochem*, v. 74, p. 1605-12.
- St-Hilaire, M., E. Bourhis, D. Levesque, and C. Rouillard, 2006, Impaired behavioural and molecular adaptations to dopamine denervation and repeated L-DOPA treatment in Nur77-knockout mice: *Eur J Neurosci*, v. 24, p. 795-805.
- St-Hilaire, M., E. Landry, D. Levesque, and C. Rouillard, 2003, Denervation and repeated L-DOPA induce a coordinate expression of the transcription factor NGFI-B in striatal projection pathways in hemi-parkinsonian rats: *Neurobiol Dis*, v. 14, p. 98-109.
- St-Hilaire, M., E. Landry, D. Levesque, and C. Rouillard, 2005, Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism: *Neurobiol Dis*, v. 20, p. 450-60.
- Sulzer, D., and L. Zecca, 2000, Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review: *Neurotox Res*, v. 1, p. 181-95.
- Szeto, H. H., 2006, Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents: *Aaps J*, v. 8, p. E521-31.

- Taira, T., Y. Saito, T. Niki, S. M. Iguchi-Ariga, K. Takahashi, and H. Ariga, 2004, DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death: *EMBO Rep*, v. 5, p. 213-8.
- Tan, E. K., and L. M. Skipper, 2007, Pathogenic mutations in Parkinson disease: *Hum Mutat*, v. 28, p. 641-53.
- Thobois, S., S. Guillouet, and E. Broussolle, 2001, Contributions of PET and SPECT to the understanding of the pathophysiology of Parkinson's disease: *Neurophysiol Clin*, v. 31, p. 321-40.
- Thomas, B., and M. F. Beal, 2007, Parkinson's disease: *Hum Mol Genet*, v. 16 Spec No. 2, p. R183-94.
- Toulouse, A., and A. M. Sullivan, 2008, Progress in Parkinson's disease-Where do we stand?: *Prog Neurobiol*, v. 85, p. 376-92.
- Udenigwe, C. C., V. R. Ramprasath, R. E. Aluko, and P. J. Jones, 2008, Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy: *Nutr Rev*, v. 66, p. 445-54.
- Uversky, V. N., 2007, Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation: *J Neurochem*, v. 103, p. 17-37.
- Valles, S. L., C. Borrás, J. Gambini, J. Furriol, A. Ortega, J. Sastre, F. V. Pallardo, and J. Vina, 2008, Oestradiol or genistein rescues neurons from amyloid beta-induced cell death by inhibiting activation of p38: *Aging Cell*, v. 7, p. 112-8.
- Van Den Eeden, S. K., C. M. Tanner, A. L. Bernstein, R. D. Fross, A. Leimpeter, D. A. Bloch, and L. M. Nelson, 2003, Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity: *Am J Epidemiol*, v. 157, p. 1015-22.
- Vanitallie, T. B., 2008, Parkinson disease: primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction: *Metabolism*, v. 57 Suppl 2, p. S50-5.
- Vauzour, D., G. Ravaioli, K. Vafeiadou, A. Rodriguez-Mateos, C. Angeloni, and J. P. Spencer, 2008, Peroxynitrite induced formation of the neurotoxins 5-S-cysteinyl-dopamine and DHBT-1: implications for Parkinson's disease and protection by polyphenols: *Arch Biochem Biophys*, v. 476, p. 145-51.

- Wakabayashi, K., F. Mori, and H. Takahashi, 2006, Progression patterns of neuronal loss and Lewy body pathology in the substantia nigra in Parkinson's disease: *Parkinsonism Relat Disord*, v. 12, p. S92-S98.
- Walkinshaw, G., and C. M. Waters, 1994, Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis: *Neuroscience*, v. 63, p. 975-87.
- Walton, M., B. Connor, P. Lawlor, D. Young, E. Sirimanne, P. Gluckman, G. Cole, and M. Dragunow, 1999, Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage: *Brain Res Brain Res Rev*, v. 29, p. 137-68.
- Weintraub, D., C. L. Comella, and S. Horn, 2008a, Parkinson's disease--Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment: *Am J Manag Care*, v. 14, p. S40-8.
- Weintraub, D., C. L. Comella, and S. Horn, 2008b, Parkinson's disease--Part 2: Treatment of motor symptoms: *Am J Manag Care*, v. 14, p. S49-58.
- Werme, M., L. Olson, and S. Brene, 2000, NGFI-B and *nor1* mRNAs are upregulated in brain reward pathways by drugs of abuse: different effects in Fischer and Lewis rats: *Brain Res Mol Brain Res*, v. 76, p. 18-24.
- Williams, C. M., and G. Burdge, 2006, Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources: *Proc Nutr Soc*, v. 65, p. 42-50.
- Wilson, A. J., D. Arango, J. M. Mariadason, B. G. Heerdt, and L. H. Augenlicht, 2003, TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis: *Cancer Res*, v. 63, p. 5401-7.
- Wingate, A. D., and J. S. Arthur, 2006, Post-translational control of Nur77: *Biochem Soc Trans*, v. 34, p. 1107-9.
- Woronicz, J. D., B. Calnan, V. Ngo, and A. Winoto, 1994, Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas: *Nature*, v. 367, p. 277-81.
- Woronicz, J. D., A. Lina, B. J. Calnan, S. Szychowski, L. Cheng, and A. Winoto, 1995, Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis: *Mol Cell Biol*, v. 15, p. 6364-76.

- Wu, Y., D. Blum, M. F. Nissou, A. L. Benabid, and J. M. Verna, 1996, Unlike MPP+, apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells is independent of mitochondrial inhibition: *Neurosci Lett*, v. 221, p. 69-71.
- Wu, Y., M. Tada, K. Takahata, K. Tomizawa, and H. Matsui, 2007, Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on apoptosis induced by etoposide, okadaic acid and AraC in Neuro2a cells: *Acta Med Okayama*, v. 61, p. 147-52.
- Yang, Y., S. Gehrke, Y. Imai, Z. Huang, Y. Ouyang, J. W. Wang, L. Yang, M. F. Beal, H. Vogel, and B. Lu, 2006, Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, p. 10793-8.
- Yokoyama, H., H. Kuroiwa, R. Yano, and T. Araki, 2008, Targeting reactive oxygen species, reactive nitrogen species and inflammation in MPTP neurotoxicity and Parkinson's disease: *Neurol Sci*, v. 29, p. 293-301.
- Youdim, K. A., A. Martin, and J. A. Joseph, 2000, Essential fatty acids and the brain: possible health implications: *Int J Dev Neurosci*, v. 18, p. 383-99.
- Youdim, M. B., and P. Riederer, 1997, Understanding Parkinson's disease: *Sci Am*, v. 276, p. 52-9.
- Zagnoli, F., and F. Rouhart, 2006, *Maladie de Parkinson 2e édition: Collection conduites: Pays-Bas*.
- Zecca, L., L. Casella, A. Albertini, C. Bellei, F. A. Zucca, M. Engelen, A. Zadlo, G. Szewczyk, M. Zareba, and T. Sarna, 2008, Neuromelanin can protect against iron-mediated oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease: *J Neurochem*, v. 106, p. 1866-75.
- Zecca, L., M. B. Youdim, P. Riederer, J. R. Connor, and R. R. Crichton, 2004, Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders: *Nat Rev Neurosci*, v. 5, p. 863-73.
- Zeng, Z.-J., and X. K. Zhang, 2007, Nongenomic actions of retinoids: Role of Nur77 and RXR in the regulation of apoptosis and inflammation: *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry* v. 6, p. 315-331.
- Zetterstrom, R. H., L. Solomin, T. Mitsiadis, L. Olson, and T. Perlmann, 1996, Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression

distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1: *Mol Endocrinol*, v. 10, p. 1656-66.

Zhang, X. K., 2007, Targeting Nur77 translocation: *Expert Opin Ther Targets*, v. 11, p. 69-79.